Série A, N° 3.828
N° d'ordre : 4.679

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Claude JACQUEMIN

1re THÈSE :

PREPARATION ET METABOLISME "IN VITRO" DES HORMONES THYROIDIENNES MARQUEES PAR LE TRITIUM

2e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 10 MAI 1962 devant la Commission d'examen

M. LEDERER — Président
M. ACHER, M. VIALLARD — Examinateurs

IMPRIMERIE
R. FOULON & Cie
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1962

Série A, N° 3.828
N° d'ordre : 4.679

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Claude JACQUEMIN

1re THÈSE :

PREPARATION ET METABOLISME "IN VITRO" DES HORMONES THYROIDIENNES MARQUEES PAR LE TRITIUM

2e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le devant la Commission d'examen

M. LEDERER — Président
M. ACHER, M. VIALLARD — Examinateurs

IMPRIMERIE
R. FOULON & Cie
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1962

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
DE BROGLIE ...	T	Théories physiques
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés
PRÉVOST	T	Chimie organique
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
FAVARD	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN ...	T	Biologie animale (S.P.C.N.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIÈRE	T	Géologie S.P.C.N. et sédim.
GAUTHERET ...	T	Biologie végét. (P.C.B.)
R. LUCAS	T	Recherches physiques
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DANJON	T	Astronomie
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC ...	T	Biologie végétale (S.P.C.N.)
Mlle CAUCHOIS .	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER ...	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Pétrographie
TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES ...	T	Théories physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie
J.-P. MATHIEU .	T	Physique (Optique)
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
MAY	T	Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et Intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral
NORMANT	T	Synthèse organique générale

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Bénard	T	Chimie minérale
Buvat	T	Botanique (E.N.S.)
Dugué	T	Statistiques mathématiques
Soulairac	T	Psychophysiologie
Ulrich	T	Physiologie végétale
Maréchal	T	Optique théorique et appliquée
Kirrmann	T	Théories chimiques
Chadefaud ...	T	Botanique
Mlle Le Breton	T	Physiologie de la nutrition
Salem	T	Mathématiques générales
Lelong	T	Application de l'analyse à la géométrie
Devillers	T	Anatomie et Histologie comparées
Ehresmann ...	T	Topologie algébrique
Françon	T	Physique (S.P.C.N.)
Glangeaud	T	Géographie physique et Géologie dynamique
Godement	T	Mathématiques (M.P.C.)
Pisot	T	Technique Mathém. de la Physique
Roch	T	Géologie
Schatzman ..	T	Astrophysique
Termier	T	Paléontologie stratigraphique
Zamansky	T	Mathématiques générales
Lennuier	T	Physique (M.G.P.)
Rizet	T	Génétique (Orsay)
Routhier	T	Géologie appliquée
Mme Tonnelat.	T	Physique théorique
Dixmier	T	Mathématiques (M.P.C.)
Souchay	T	Chimie générale
Aigrain	T	Electrotechnique générale
Brusset	T	Chimie systématique
M. Lévy	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme Chaix ..	T	Chimie biologique
Mme Hurel-Py.		Biologie végétale (P.C.B.)
Piaux	T	Chimie (M.P.C.)
Brun	T	Mécanique théorique des fluides
Lederer	T	Chimie biologique
Mme Dubreil .	T	Mathématiques (Agrég.)
Mme Lelong ..	T	Mathématiques (E.N.S.)
Bellair	T	Géologie (S.P.C.N.)
Cotte	T	Physique électricité
J.-E. Dubois ...	T	Chimie organique
Lamotte	T	Zoologie (E.N.S.)
André Michel .	T	Chimie minérale (Orsay)
Olmer	T	Energétique générale
Rouault	T	Electricité (Orsay)
Gauthier	T	Mécanique appliquée
Barchewitz ...	T	Chimie physique
Brossel	T	Physique atomique
Buser		Physiologie comparée
Camus		Physiologie végétale (B.M.P.V.)
Castaing	T	Physique (Orsay)
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay)
Noirot		Evolution des Etres org.
Pannetier	T	Chimie générale (Orsay)
Possompes	T	Zoologie
Pullmann	T	Chimie théorique
Teillac	T	Physique nucléaire et Radioactivité
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique
Ville	T	Econométrie
Willemart ...		Chimie (P.C.B.)
Dode	T	Chimie (Orsay)
Freymann	T	Recherches physiques
Guinochet	T	Biol. vég. S.P.C.N. (Orsay)
Rollet	T	Chimie (P.C.B.)
Mlle Josien ...	T	Chimie (S.P.C.N.)
Chevalley	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
Arnoult	T	Electronique (Orsay)
Chapelle	T	Physique (Orsay)
Delange	T	Mathématiques (Orsay)
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay)
Germain	T	Mécanique théorique des fluides
G. Lucas	T	Géologie
Allard	T	Chimie physique
Berthelot	T	Physique fondament. des hautes énergies (Orsay)
Bricard	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère
Mme Albe-Fessard		Psychophysiologie
Friedel		Physique des Solides (Orsay)
M. Julia		Etudes des Moléculaires naturelles complexes
Lender	T	Biologie animale (S.P.C.N., Orsay)
Magat		Physico-chimie des radio-éléments
Mlle Quintin ..	T	Electrochimie
Monod	T	Chimie du métabolisme
Benoit	T	Physiol. anim. (Orsay)
De Possel	T	Analyse numérique
Charlot	T	Chimie analytique
Haïssinsky	T	Radiochimie
Lemée	T	Physiol. vég. B.M.P.V. (Orsay)
Guérin	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
M. Chatelet .		Chimie (P.C.B.)
Jean	T	Physique nucl. (Orsay)
Mattler	T	Physique S.P.C.N. (Orsay)
Louis Michel .		Phys. théor. des Hautes Energies (Orsay)
Bergerard		Zoologie (Orsay)
Bertein		Electronique (Orsay)
Bouissieres ...		Chimie des Radioéléments (Orsay)
Mme Couture .		Thermodynamique et Mécanique physique

Ellenberger ..		Géologie appliquée sur le terrain
Franc		Biologie animale (P.C.B.)
Schnell		Botanique tropicale (Orsay)
Stolkowski ...		Physiologie générale
Acher		Chimie biologique (Orsay)
Baudoin		Biologie animale (P.C.B.)
Beaumont		Biologie animale (S.P.C.N.)
Blamont		Géophysique Ionosphère
Bourreau		Botanique
D. Curie		Physique (M.G.P.)
Durand-Delga .		Géologie
Freon	T	Chimie organ. (Orsay)
Heller		Physiologie végétale
Tortrat		Calcul des probabilités
Cailleux		Géologie (S.P.C.N.)
Magnan	T	Physique (S.P.C.N.)
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire
Mlle Fourcroy		Biologie végétale (S.P.C.N.)
Mme Choquet-Bruhat	T	Mécanique analytique e Mécanique céleste
Mlle Veil		Physiologie générale
Lwoff	T	Microbiologie
Siestrunck ...	T	Mécanique physique e expérimentale
Lacombe	T	Métallurgie des métau nucléaires
Brochard	T	Physique P.C.B. (Orsay
Cabannes	T	Mécanique générale
Lesieur	T	Mathématiques M.P.C. (Orsay)
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay)
Caire		Géographie physique et Géologie dynamique
Comolet		Mécanique des fluides
Corabœuf		Physiologie animale
Delloue		Physique de l'exosphère
Gorenflot ...		Botanique II (Orsay)
Houillon		Biologie animale (P.C.B.
J. Jullien		Chimie (P.C.B.)
Malgrange ...		Tech. math. de la Phys
Olivier		Anthropologie
Nozeran	T	Botanique II (Orsay)
Blanc-Lapierre		Physique E.N.S. (Orsay

Secrétaire général ..... R. Poullain

A MES PARENTS

A MON MAITRE

Monsieur le Professeur Jean ROCHE

Recteur de l'Académie de Paris
Professeur au Collège de France
Membre de l'Académie de Médecine

Qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et qui a toujours suivi mes recherches avec intérêt et bienveillance.

Avec l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur Jacques NUNEZ

Maître de Recherche au C.N.R.S.

Qui a assuré ma formation scientifique dès mon entrée au laboratoire et dont les conseils et les directives ont permis l'aboutissement de ce travail.

En témoignage de mon amitié.

J'adresse mes respectueux remerciements

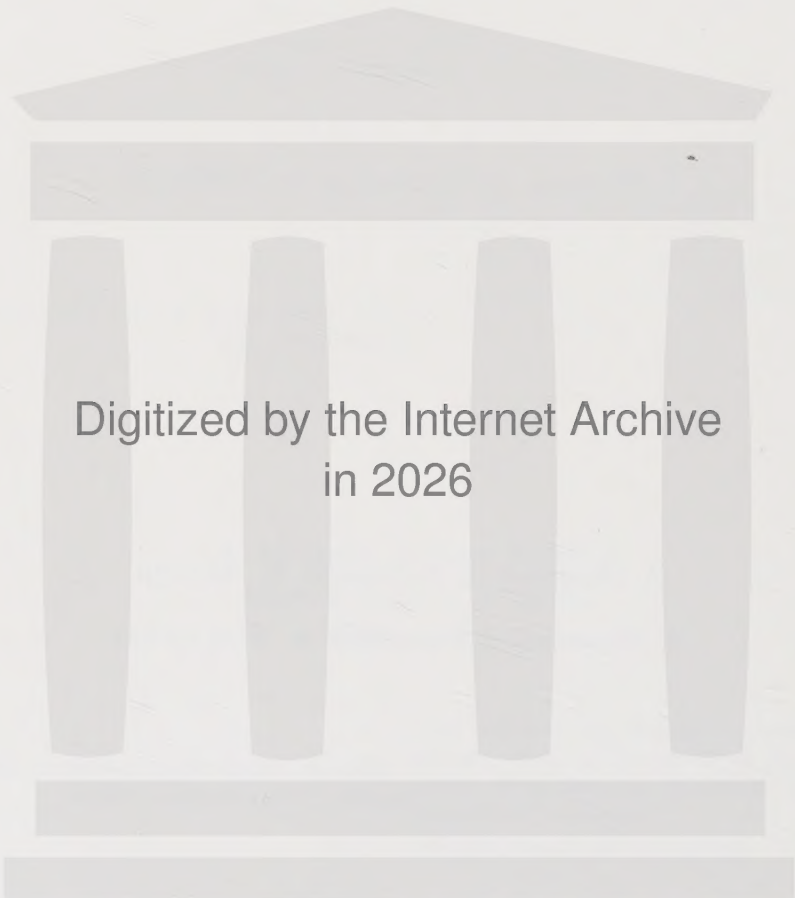
A Monsieur le Professeur E. LEDERER

Qui a bien voulu me faire l'honneur de présider cette thèse.

A Monsieur le Professeur R. ACHER

A Monsieur le Professeur R. VIALLARD

Pour la bienveillante attention avec laquelle ils ont examiné ce travail.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538124_0035

INTRODUCTION GENERALE

Le développement récent de la biochimie thyroïdienne a porté principalement sur la biosynthèse, le transport et le métabolisme périphérique des hormones. Chacun de ces trois processus correspond à une étape du mécanisme hormonal localisée dans un tissu ou un milieu particulier. Le premier a pour siège la glande thyroïde, le second le plasma et le troisième l'ensemble des tissus récepteurs, ce qui permet l'étude indépendante de chacun.

La biosynthèse comporte un certain nombre d'étapes : *a*) La concentration de l'iodure sanguin par le corps thyroïde [9, 13, 139]; *b*) L'oxydation de l'iodure en iode [6, 12, 24, 92]; *c*) L'incorporation de l'iode thyroïdien au sein de protéines iodées (« thyroglobuline ») [12, 85, 130] et la formation en un premier temps des iodotyrosines [28, 50, 93]; *d*) L'apparition dans la thyroglobuline des iodothyronines [43, 45, 59, 94, 110], par condensation des iodotyrosines [47, 57]; *e*) La libération des acides aminés iodés [41] par protéolyse de la thyroglobuline [44, 62, 91]; *f*) La désiodation spécifique des iodotyrosines et le recyclage de l'iode libéré [95, 101]; *g*) La sécrétion des hormones [131]. Ce schéma a été confirmé à plusieurs reprises et apparaît définitif ; mais les mécanismes des processus qui s'y trouvent individualisés sont presque totalement inconnus.

Le problème de la nature de l'hormone circulante a évolué très rapidement au cours des deux dernières années. A la notion d'hormone libre dans le sang a été substituée celle d'une combinaison avec des protéines sériques. On a identifié d'abord une inter-α-globuline, dénommée T.B.P. (« thyroxine binding protein ») [38, 90, 138], qui fixe spécifiquement la thyroxine dans un complexe hydrosoluble. L'amélioration des techniques d'électrophorèse sur papier et sur gel d'amidon a permis d'individualiser l'existence d'autres systèmes protéiques doués de capacité fixatrice : les « pré-albumines » [55], une fraction des albumines [14] et enfin une « post-albumine » [14]. Ces dénominations correspondent à des critères de mobilité en électrophorèse sur papier pour des conditions expérimentales définies [128].

On a également signalé la présence de fractions protéiques analogues à la T.B.P. sérique dans divers liquides extra-vasculaires (cérébro-spinal [5], synovial et pleural entre autres [32]). Dans les tissus, on a décrit une T.B.P. cellulaire douée d'une capacité importante mais d'une affinité plus réduite que son homologue sérique [120]. Les travaux en cours ont essentiellement pour objet, l'étude des affinités et des capacités de fixation, et des équilibres qui en découlent. Ces systèmes assurent probablement le transport des hormones, du plasma aux cellules réceptrices et la régulation de leur distribution.

Le troisième grand groupe de problèmes qui a retenu l'attention porte sur le métabolisme périphérique des hormones thyroïdiennes. Dans une première période, les recherches ont porté sur des phénomènes physiologiques globaux : nature des produits de la dégradation présents dans les urines et les fèces et cinétiques de leur apparition. Le produit iodé final de la dégradation est constitué par de l'iodure et, selon l'iodothyronine étudiée, l'élimination de celui-ci a lieu avec des vitesses différentes [84, 119]. L'élimination biliaire de l'hormone et de ses dérivés tant du point de vue de sa cinétique [96], que de la nature des corps formés [129], a permis d'établir la présence dans la bile de l'iodure, des dérivés pyruviques et de conjugués des hormones avec l'acide glucuronique ou l'acide sulfurique [97], paraissant jouer un rôle dans la régulation du taux de l'hormonémie au cours de leur circulation entéro-hépatique. Les hormones thyroïdiennes sont partiellement transformées dans les tissus en leurs dérivés acétiques, dont certains conservent une activité biologique et subissent ultérieurement la conjugaison et la désiodation. Le schéma réactionnel que l'on a été conduit à admettre est le suivant : l'iodothyronine subit la désamination oxydative et donne naissance au dérivé pyruvique correspondant, qui se transforme rapidement en son isologue acétique. Cette transformation est réalisée par un système enzymatique mitochondrial soluble activé par le DPN [4, 132]. On a récemment montré que les thyronines incomplètement iodées pouvaient être oxydées « in vitro » par le système acide ascorbique-Fe^{2+} - O_2 et la polyphénoloxydase de champignon en donnant naissance à des composés hydroxylés en position 3' ; cependant une telle activité polyphénoloxydasique n'a pas été retrouvée dans les tissus animaux. L'ortho-hydroxylation par la polyphénoloxydase est suivie par la rupture du pont diphényl-éther [70].

Comme les études métaboliques globales l'avaient établi, les hormones thyroïdiennes sont désiodées au sein des tissus. La réaction a été bien étudiée au cours de ces dernières années ; on a même purifié le système enzymatique qui la catalyse [67, 123], mais on n'a que peu de renseignements sur la nature de ses produits. En effet, si

des intermédiaires de désiodation ont parfois pu être identifiés au cours d'études « in vivo » [30, 100, 104], il n'en est pas de même dans les expériences réalisées « in vitro » où le seul métabolite iodé présent est l'iodure [117]. Cette réaction importante nous a paru pouvoir être étudiée par l'utilisation de molécules marquées avec un isotope radioactif différent de ^{131}I ; aussi nous sommes-nous proposés de préparer des iodothyronines marquées dans leur squelette carboné. Nous avions pour le faire le choix entre ^{14}C et ^{3}H. Nous n'avons pas utilisé ^{14}C, car les formes sous lesquelles cet isotope est disponible imposeraient des synthèses extrêmement laborieuses et conduiraient à des iodothyronines d'activité spécifique insuffisante à des doses physiologiques. Nous avons donc employé le tritium, qui a pour avantages d'être fourni sous forme de gaz dont la pureté atteint 99 % ou d'eau d'activité maximum égale à 5 C/ml. De plus, le prix de revient par mC des produits synthétisés est réduit.

L'objet de notre travail est la préparation des thyronines marquées par ^{3}H et ^{131}I, l'étude de leurs métabolites tissulaires au cours de la réaction de désiodation, et le mécanisme de celle-ci.

ABREVIATIONS

T_0 : thyronine
T_1 : iodo-3, thyronine
T'_1 : iodo-3', thyronine
T_2 : iodo-3, 5, thyronine
T'_2 : iodo-3, 3', thyronine
T''_2 : iodo-3' 5', thyronine
T_3 : iodo-3, 5, 3', thyronine
T'_3 : iodo-3, 3', 5', thyronine
T_4 : thyroxine
Tyr : tyrosine
MIT : iodo-3, tyrosine
DIT : iodo-3, 5, tyrosine
DOPA : hydroxy-3, 4, phénylalanine
TyrA : acide hydroxy-4, phénylacétique
MIH : iodo-2 (ou 4), histidine
OE : œstradiol
MOE : iodo-2 (ou 4), œstradiol
DOE : iodo-2, 4, œstradiol
3'OH-T_0 : hydroxy-3', thyronine
FMN : riboflavine-monophosphate
DPN : diphosphopyridine nucléotide

T_0A : isologue acétique

T_3A : isologue acétique

T_4A : isologue acétique

Première partie

SYNTHESE DES THYRONINES MARQUEES PAR LE TRITIUM

METHODES GENERALES DE PREPARATION DES THYRONINES

Depuis la description de la première synthèse de la thyroxine par HARINGTON et BARGER, en 1927, plusieurs autres méthodes ont été publiées. Une revue rapide des principes généraux des procédés utilisables nous indiquera leur champ d'application et leurs avantages respectifs.

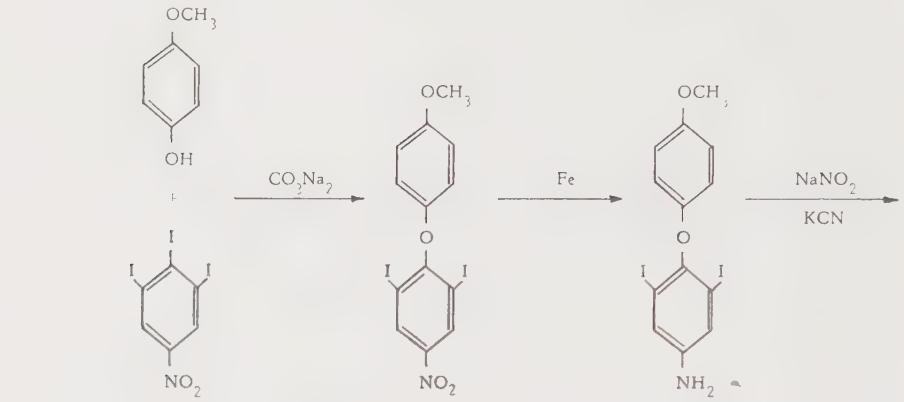
METHODE DE HARINGTON ET BARGER [48]

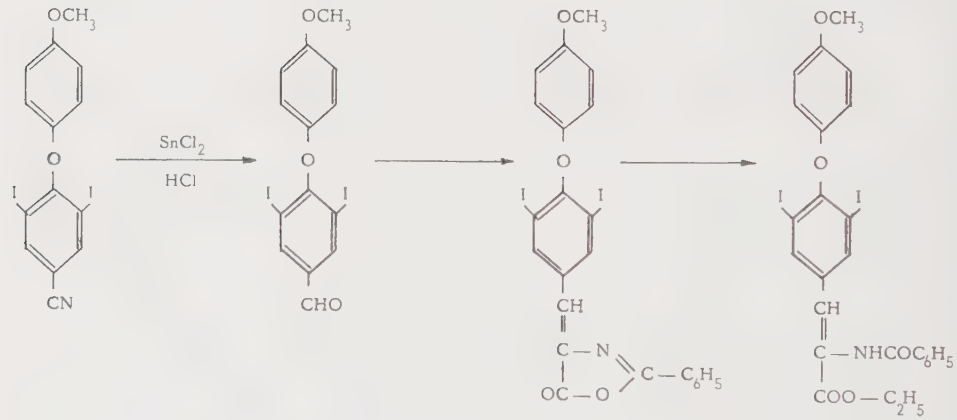
C'est la plus ancienne, elle comporte les nombreuses étapes suivantes : le iodo-3, 4, 5, nitro-1, benzène est condensé sur le méthoxy-4, phénol en milieu alcalin (Na_2CO_3). Le iodo-3, 5, (méthoxy-4', phénoxy-)4, nitro-1, benzène est réduit par le fer en iodo-3, 5, (méthoxy-4', phénoxy-)4, amino-1, benzène. Ce dernier produit est diazoté par $NaNO_2$ et le diazoïque décomposé en présence de KCN : cette réaction de SANDMEYER conduit au iodo-3, 5, (méthoxy-4', phénoxy-)4, benzonitrile. La méthode de STEPHEN modifiée le transforme en iodo-3, 5, (méthoxy-4', phénoxy-)4, benzaldéhyde. Cet aldéhyde est converti en azlactone par condensation avec l'acide hippurique. L'hydrolyse de l'azlactone fournit le iodo-3, 5, (méthoxy-4', phénoxy-)4, α-benzamidocinnamate d'éthyle. Par traitement à l'acide iodhydrique, on obtient l'acide α-amino, β-[iodo-3, 5, (hydroxy-4', phénoxy-)4, phényl] propionique, ou iodo-3, 5, thyronine.

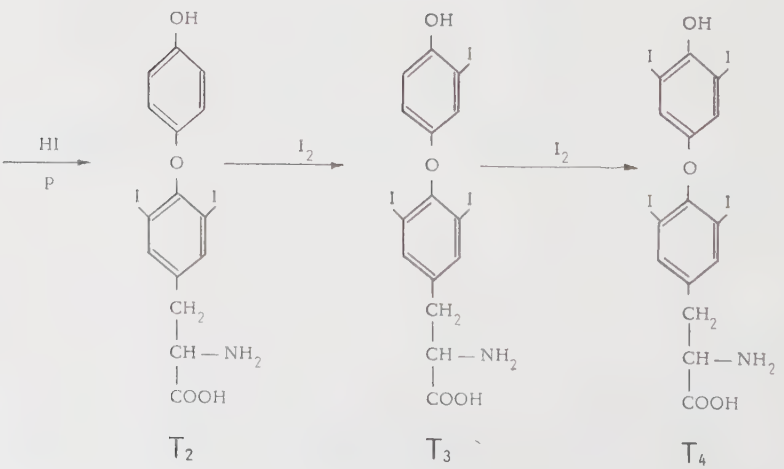
L'iodation en milieu alcoolo-ammoniacal conduit successivement à la iodo-3, 5, 3', thyronine et à la iodo-3, 5, 3', 5', thyronine, ou thyroxine (*Tableau I*).

TABLEAU I

Synthèse de T_2, T_3 et T_4 par la méthode de HARINGTON et BARGER







T_2 T_3 T_4

METHODE DE CHALMERS, DICKSON, ELKS ET HEMS [18]

Cette méthode, relativement récente, a été mise au point dans les Laboratoires Glaxo où elle est utilisée à des fins industrielles. Son principal avantage est de permettre la préparation de composés de la série L ; en effet, elle ne comporte aucune étape créant l'asymétrie. A partir de L-tyrosine naturelle, on prépare l'ester éthylique de la nitro-3, 5, N-acétyltyrosine que l'on condense avec le méthoxy-4, phénol en présence de chlorure de *p*-toluène sulfonyle et de pyridine. L'ester éthylique de l'O-méthyl, nitro-3, 5, N-acétylthyronine est réduit en ester éthylique de l'O-méthyl, amino-3, 5, N-acétylthyronine par l'hydrogène en présence de Palladium-charbon. Par réaction de SANDMEYER, on obtient l'ester éthylique de l'O-méthyl, iodo-3, 5, N-acétylthyronine, qu'un traitement à l'acide iodhydrique transforme en iodo-3, 5, thyronine (*Tableau II*).

Ces deux méthodes permettent la préparation de trois thyronines, la iodo-3, 5, thyronine (T_2), la iodo-3, 5, 3', thyronine (T_3) et la iodo-3, 5, 3', 5', thyronine ou thyroxine (T_4) qui constituent la même série.

Pour accéder aux autres thyronines naturelles découvertes dans la thyroïde [110], le plasma [102], d'autres méthodes ont été mises au point.

METHODE DE ROCHE, MICHEL ET WOLF [107, 108]

Cette méthode utilise la désiodation catalytique, déjà décrite par HARINGTON [46], mais appliquée à divers substrats et suivie éventuellement par l'iodation en deux temps des produits obtenus (*Tableau III*). Ceux-ci peuvent être classés en deux séries, l'une est constituée par la iodo-3, thyronine (T_1), la iodo-3, 3', thyronine (T'_2) et la iodo-3, 3', 5', thyronine (T'_3), l'autre part la thyronine (T_0), la iodo-3', thyronine (T'_1) et la iodo-3', 5', thyronine (T''_2).

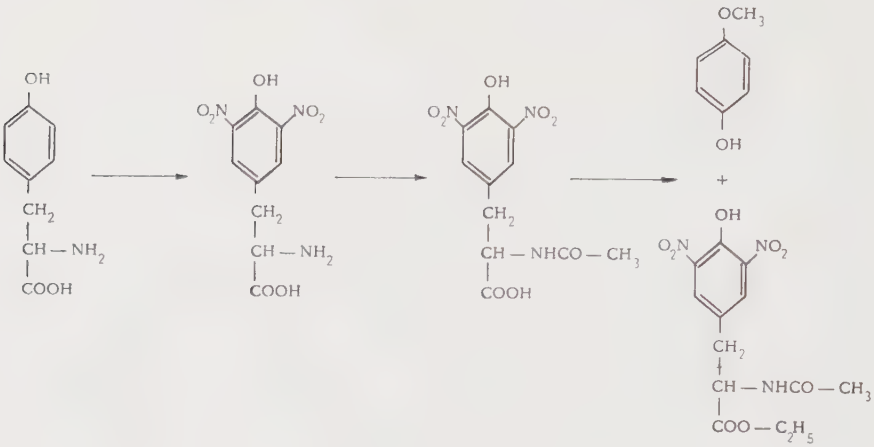
La thyronine et la iodo-3, thyronine ont été également préparées par synthèse totale ; nous allons exposer les grandes lignes de ces méthodes.

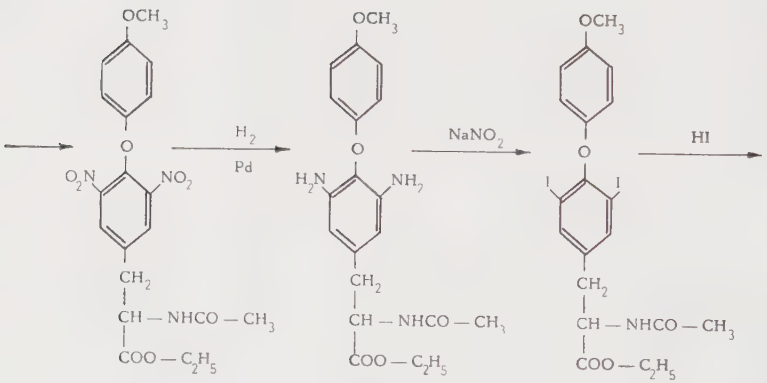
METHODE DE HARINGTON [46]

La thyronine a été synthétisée dès 1926 par les réactions suivantes : le bromo-4, anisole est condensé avec le phénol en présence de cuivre et de potasse pour donner le méthoxy-4', phénoxybenzène. Ce der-

TABLEAU II

Synthèse de T_2, T_3 et T_4 par la méthode de CHALMERS, DICKSON, ELKS et HEMS





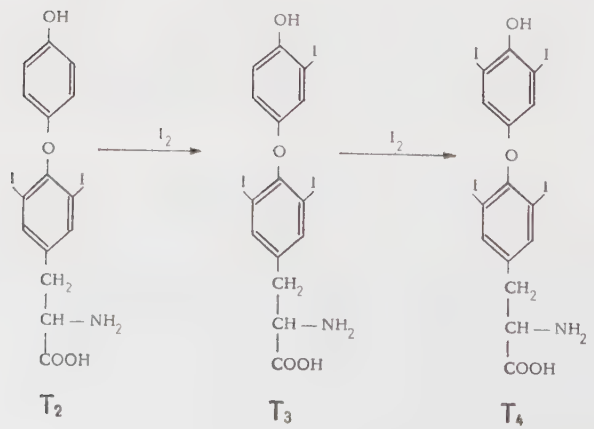
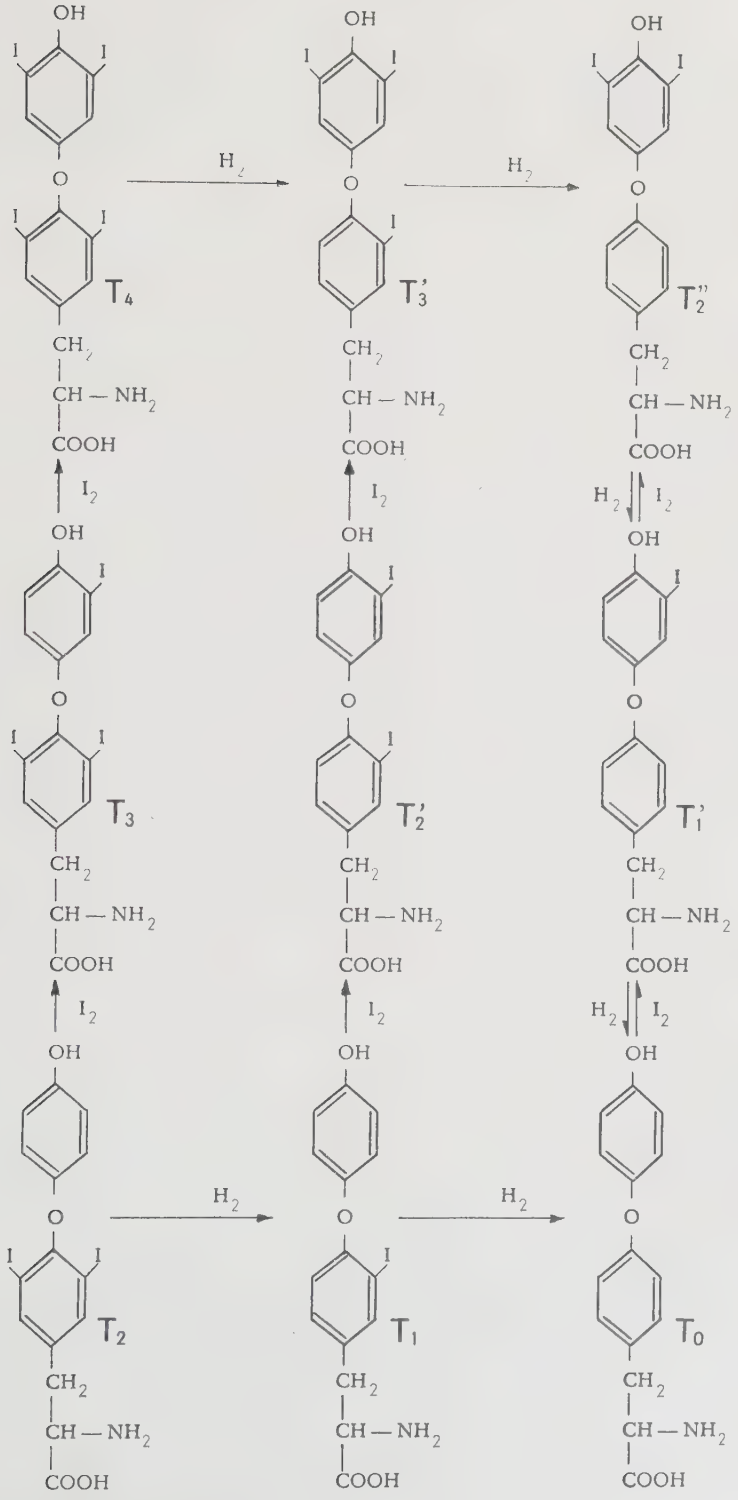


TABLEAU III

Préparation de T_1 et de T_0 et de leurs dérivés par la méthode de ROCHE, MICHEL et WOLF



nier est transformé en (méthoxy-4', phénoxy-)4 benzaldéhyde par la méthode de GATTERMANN. L'obtention de la thyronine peut se faire par deux voies : celle de l'azlactone et celle de l'hydantoïne. Dans les deux cas, le traitement des produits réactionnels par l'acide iodhydrique conduit à la thyronine (*Tableau IV*).

Depuis, des modifications tendant à améliorer le rendement en aldéhyde ont été apportées par HARINGTON et PITT-RIVERS [49].

METHODE DE ROCHE, MICHEL, NUNEZ ET JACQUEMIN [103]

Cette méthode, postérieure à celle décrite par GEMILL et coll. [36] qui était une adaptation de la synthèse de la iodo-3, 5, thyronine par HARINGTON et BARGER, présente l'avantage de fournir de meilleurs rendements pour l'obtention de la iodo-3, thyronine.

Elle comporte 6 étapes : la préparation du nitro-3, (méthoxy-4', phénoxy-)4, benzaldéhyde repose sur la condensation en milieu alcalin aqueux du nitro-3, chloro-4, benzaldéhyde avec le méthoxy-4, phénol. On prépare successivement à partir de ce dernier corps, l'azlactone avec l'acétylglycine, puis l'acide N-acétylaminoacrylique correspondant. Par réduction catalytique (Nickel de Raney) de ce corps, on obtient l'acide amino-3, (méthoxy-4', phénoxy-)4, α-acétamidocinnamique qui est diazoté : le sel de diazonium est détruit en présence d'iodure de potassium, et conduit à l'acide iodo-3, (méthoxy-4', phénoxy-)4, α-acétamidocinnamique. Un traitement par l'acide iodhydrique conduit finalement à la iodo-3, thyronine (*Tableau V*).

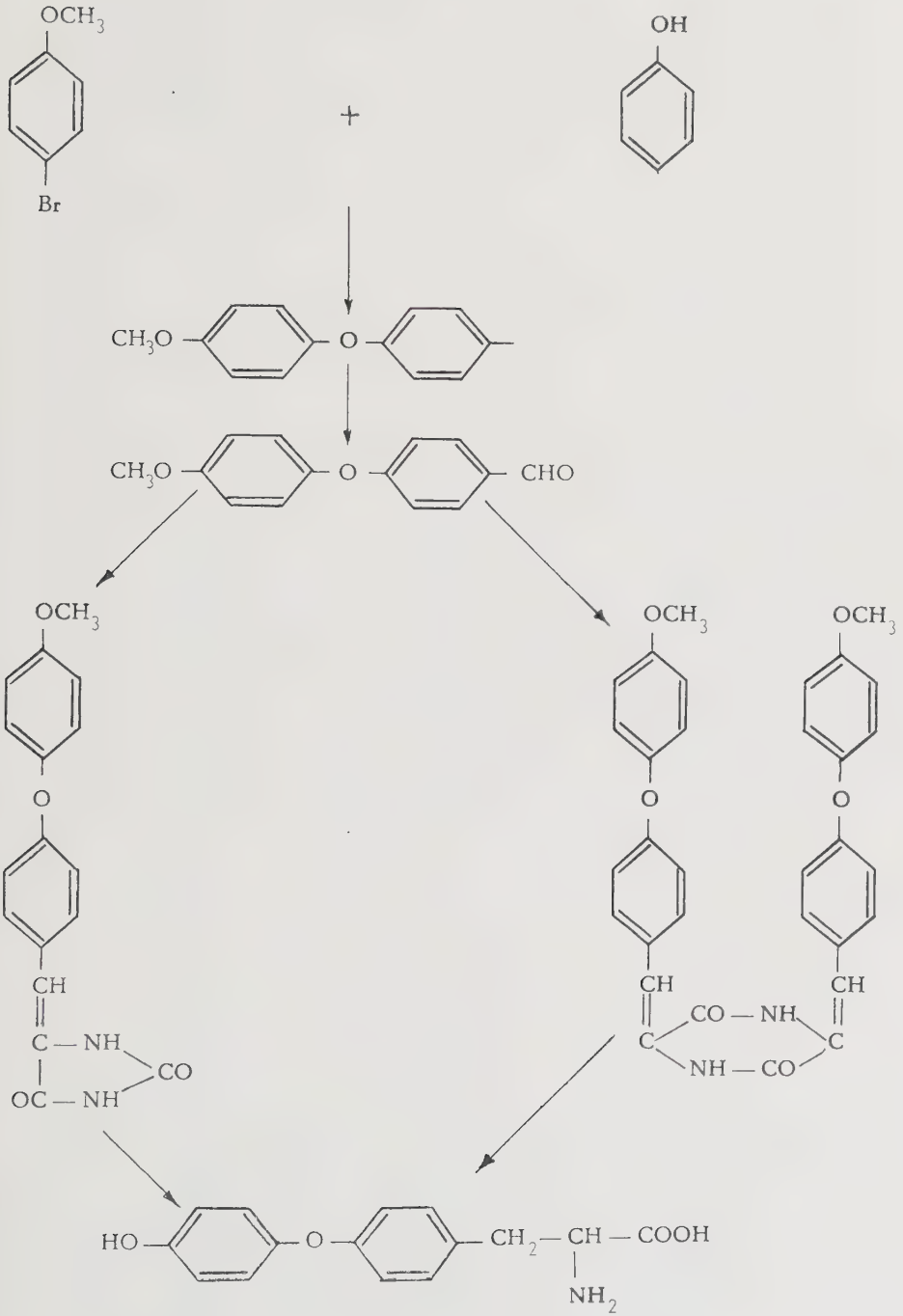
Cet exposé des méthodes générales de préparation des thyronines nous a permis de rappeler que l'on pouvait distinguer trois séries de ces composés :

— la série de T_0, qui comprend T_0, T'_1, T''_2 ;
— la série de T_1, qui comprend T_1, T'_2, T'_3 ;
— la série de T_2, qui comprend T_2, T_3, T_4.

Nous nous sommes proposés de synthétiser l'ensemble de ces thyronines marquées par le tritium. Les méthodes que nous avons rapidement résumées comportent de nombreuses étapes, nous avons donc écarté le projet de préparer des thyronines tritiées par synthèse totale ; en effet, nous avons calculé qu'il aurait fallu préparer plusieurs grammes de matière première tritiée pour espérer aboutir à des quantités raisonnables de produit final. Nous aurions dû mettre en œuvre des volumes de tritium considérables, dont la manipulation eût été délicate et même dangereuse, du fait de leur grande radioactivité. Nous avons donc mis au point des méthodes permettant de fixer le

TABLEAU IV

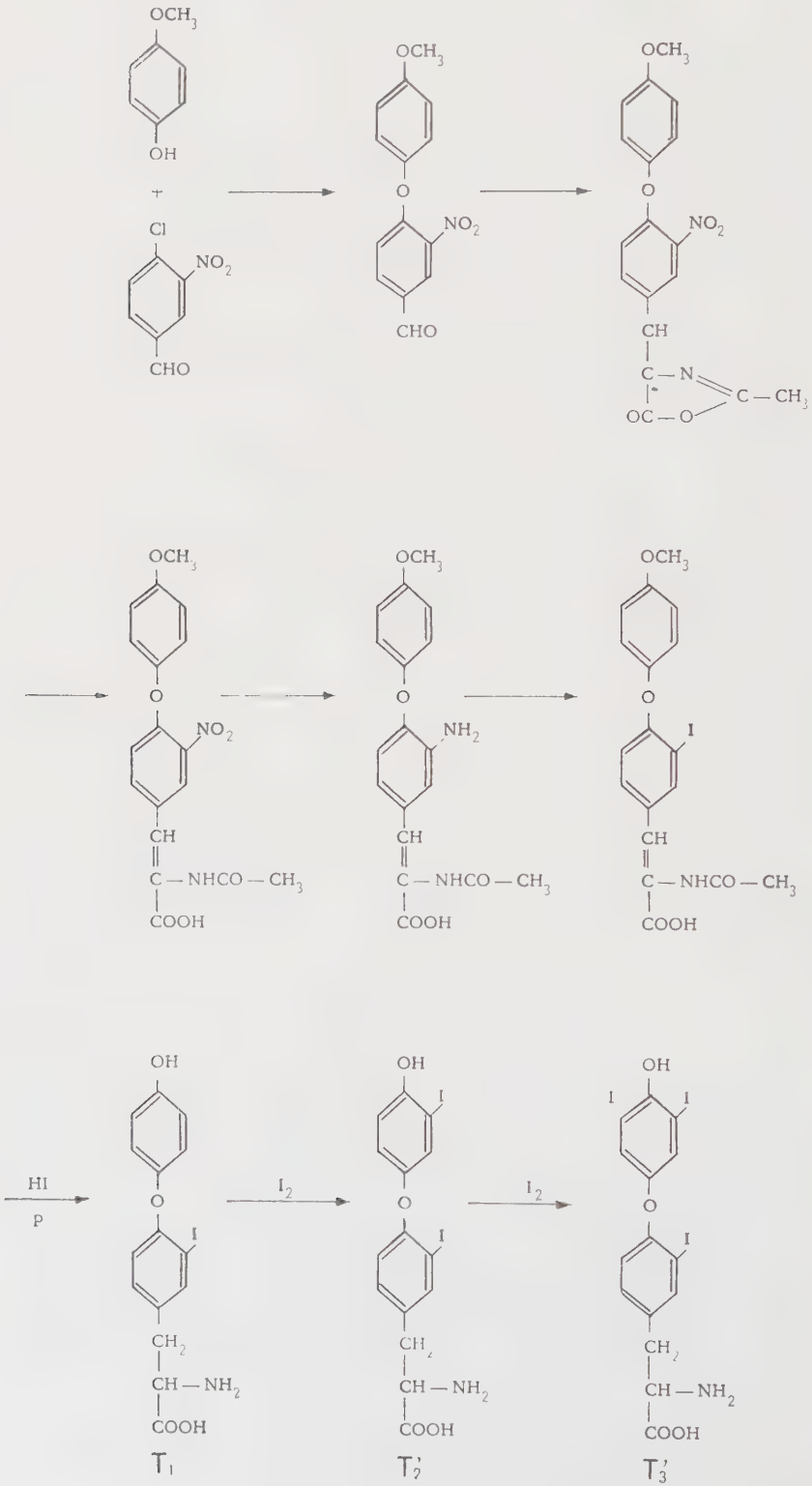
Synthèse de T_0 par la méthode de HARINGTON



T_0

TABLEAU V

Synthèse de T_1, T'_2, T'_3
par la méthode de ROCHE, MICHEL, NUNEZ et JACQUEMIN



tritium sur des corps conduisant rapidement aux thyronines. La T_0 et la T_1 ont été préparées par déshalogénation catalytique de la T_2. La T_2 a été préparée par saturation de la double liaison éthylénique de l'acide iodo-3, 5, (méthoxy-4', phénoxy-)4, α-benzamidocinnamique.

Depuis le début de notre travail, deux synthèses de thyronines tritiées ont été publiées.

— La première, due à Tata et Brownstone [126], utilise comme produit de départ l'acide acétoxy-4, α-acétamidocinnamique qui par réduction catalytique avec du tritium conduit à la O, N-diacétyltyrosine marquée en α-β de la chaîne. Une hydrolyse partielle de ce corps fournit la N-acétyltyrosine ; par iodation, on obtient la iodo-3, 5, N-acétyltyrosine : l'incubation à 37° pendant douze jours de cette dernière, dans les conditions décrites par Pitt-Rivers [87], conduit à la N-acétylthyroxine. La thyroxine est obtenue par hydrolyse chlorhydrique. Cette méthode comporte de nombreuses manipulations sur des composés tritiés ; le rendement de la condensation est très faible et de plus des produits de décomposition apparaissent pendant la longue incubation.

— La seconde méthode, publiée par Michel et coll. [81], présente comme avantage sur celle décrite par Tata, l'obtention de corps de la série L ; mais elle est extrêmement laborieuse. La synthèse de T_2 comporte quatre étapes : préparation d'anisole tritié en méta- par réduction avec le gaz tritium du iodo-3, anisole ; préparation de bromure de *p-p'*-dianisyliodonium ; condensation de ce dernier avec l'ester éthylique de la N-acétyl, iodo-3, 5, tyrosine. L'ester éthylique de la N-acétyl, iodo-3, 5, thyronine obtenu conduit, après hydrolyse, à la L-T_2 marquée par le tritium en position 2' ou 6'.

- I -

METHODES DE COMPTAGE DES CORPS TRITIES

Le tritium est un isotope peu coûteux, qui permet de préparer des composés organiques marqués d'activité spécifique très élevée. Ce fait est d'un grand intérêt lorsqu'il s'agit d'obtenir des substances naturelles telles que les hormones. Mais l'utilisation du tritium présente certaines difficultés.

Le tritium émet un rayonnement β de faible énergie (0,018 Mev) absorbé par l'air et la fenêtre de mica d'un tube de Geiger-Muller. Jusqu'en 1954, il était nécessaire, pour le compter, d'utiliser une chambre d'ionisation, ce qui présentait de gros inconvénients [137]. A partir de 1954, la commercialisation de spectromètres à scintillation liquide a entraîné la mise au point et le développement de toute une série de techniques nouvelles adaptées à ce nouveau mode de comptage.

1) *Principe de la scintillation liquide*

La scintillation liquide est une extension de la méthode de détection des rayonnements γ par scintillation-cristal.

Les rayons β de faible énergie ne peuvent pas traverser le verre et encore moins l'armature métallique du cristal scintillant ; par mise en solution, on réalise un contact étroit entre la substance radioactive et un « scintillateur », c'est-à-dire un corps capable d'émettre des photons quand il est frappé par des rayons β. Le rendement de l'opération dépend de l'énergie de rayonnement de l'isotope, de la nature du scintillateur et de celle du solvant ; la coloration du milieu, la présence d'impuretés absorbent une partie de la lumière émise : ce phénomène a reçu dans les pays anglo-saxons le nom de : « quenching », c'est-à-dire extinction [53].

a) Le « scintillateur » doit être un produit courant et être soluble dans le solvant, même aux basses températures d'utilisation.

Parmi une série d'environ soixante composés ayant de bonnes propriétés scintillantes, les plus utilisés sont : le p-terphényl (Φ_3) et le 2, 5-diphényloxazole (PPO) [27, 51].

Pour déplacer le spectre d'émission vers les plus grandes longueurs d'onde, on ajoute fréquemment au premier scintillateur, appelé « scintillateur primaire », une seconde substance nommée : « scintillateur secondaire ». Le plus répandu des scintillateurs secondaires est le 1, 4-bis [2-(5-phényloxazolyl)]-benzène ou POPOP [52].

b) Le solvant doit avoir une bonne énergie de transfert, mais aussi un faible coefficient d'absorption pour la lumière émise par le scintillateur (faible « quenching »). Parmi une série de substances organiques essayées, le toluène donne les meilleurs résultats [53]. Nous avons utilisé pendant tout notre travail, un mélange scintillant contenant 4 g de PPO et 0,050 g de POPOP par litre de toluène.

Si le toluène est le meilleur solvant connu quant au rendement de comptage qu'il permet d'obtenir, s'il dissout bien les scintillateurs qui sont pour la plupart des composés polyaromatiques, il n'en est pas toujours de même des composés dont on veut connaître la radioactivité. Pour pallier cet inconvénient, divers biais ont été employés : peu d'entre eux sont d'un usage général ; nous nous limiterons à traiter de ceux que nous avons utilisés au cours de notre travail.

2) *Comptage de solutions aqueuses*

La non-miscibilité de l'eau et du toluène est un obstacle au comptage en scintillation liquide de l'eau tritiée et des solutions aqueuses de composés marqués par le tritium. Une phase unique peut être aisément réalisée par l'addition de petites quantités d'éthanol absolu et l'obtention d'un système ternaire. Lors de la constitution de ce mélange, il ne faut pas oublier que l'eau et l'éthanol, du fait de leur inaptitude au transfert d'énergie, diminuent la hauteur des impulsions, c'est-à-dire le rendement du comptage. Il est donc important d'effectuer le comptage sur la plus petite quantité d'eau compatible avec une émission de rayonnement mesurable dans de bonnes conditions de précision statistique. Par ailleurs, la quantité d'éthanol utilisée doit être le minimum nécessaire à la réalisation du mélange ternaire et à sa stabilité aux basses températures où sont faits les comptages. Une étude systématique des rapports eau/éthanol pour lesquels les rendements de comptage sont maximum, a été faite par Zeigler et ses collaborateurs [144]; à partir de leurs résultats, nous avons établi des conditions standard que nous avons utilisées pour nos mesures. Pour un volume de 10 ml de toluène, nous ajoutons 1 ml d'éthanol

absolu : ce mélange permet d'introduire jusqu'à 50 μl d'eau ou de solution aqueuse et de compter la radioactivité incluse avec un rendement minimum de 8,5 %.

Le rendement est calculé de la manière suivante : on prépare un échantillon ayant la même composition en toluène-eau-éthanol que l'essai dont on désire connaître l'activité. On ajoute à ce mélange une quantité connue de toluène tritié dont l'activité spécifique en désintégrations par minute (d.p.m.) est connue. Cet échantillon est compté ; le rendement est exprimé par le rapport :

$$\frac{\text{nombre de coups comptés réellement}}{\text{d.p.m.}} \times 100$$

Ce pourcentage permet de corriger le comptage obtenu pour l'essai et d'exprimer son activité absolue en d.p.m. Dans le cas d'un échantillon dont la composition n'est pas reproductible, par exemple un extrait biologique, la détermination de son activité peut être faite par la méthode du témoin incorporé [19]. Après comptage de l'échantillon, on lui ajoute un petit volume d'une solution standard de toluène tritié et on le compte de nouveau : la différence entre ce dernier comptage et le premier nous donne le nombre de coups dus à l'ajout de la solution standard et de ce fait le rendement avec lequel l'opération s'est effectuée. Ce rendement peut valablement être considéré comme celui du premier comptage, celui avec lequel l'activité de l'échantillon a été déterminée.

Nous avons utilisé cette dernière méthode pour l'étalonnage des solutions de thyronines tritiées. Les caractères de solubilité de tous les corps de cette série sont déjà étroits ; ils sont encore réduits par la nécessité de dissoudre les thyronines dans des solvants qui ne perturbent pas les incubations en présence de tissus, de fractions cellulaires ou de préparations enzymatiques purifiées. Les thyronines ont donc été dissoutes dans de la soude diluée (0,1 N) ou mieux dans du propylène glycol à 50 % ; des volumes de l'ordre de 50 μl de ces deux solutions ne diminuent pas les rendements des comptages sensiblement plus que le même volume d'eau.

3) *Comptages d'extraits tissulaires et de tissus*

Le comptage d'extraits salins est effectué comme celui des solutions aqueuses dont nous venons de parler ; celui des extraits par les solvants organiques, n-butanol par exemple, est en général facilité par leur miscibilité avec le toluène.

Par contre, la détermination de la radioactivité contenue dans les plasmas ou sérums, les tissus ou les fractions cellulaires, nécessite la mise en œuvre d'une technique appropriée.

En 1956, PASSMAN, RADIN et COOPER [86] ont décrit la préparation d'une base soluble dans les solvants organiques, l'hydroxyde de *p*-(diisobutyl-cresoxyethoxyéthyl) diméthyl-benzylammonium, dont le nom commercial est « Hyamine ». En 1957, VAUGHAN, STEINBERG et LOGAN [134] se sont servis d'une solution molaire d'Hyamine dans le méthanol pour dissoudre des acides aminés et des protéines. Un millilitre de cette solution dissout au moins 20 mg d'acide aminé et 10 mg d'une protéine cristallisée. Lorsqu'il s'agit de protéines tissulaires complexes provenant d'un précipité trichloracétique, le pouvoir solvant est le même, mais il est nécessaire de porter la température du mélange à 60° pendant une à deux heures. En 1958, CHEN [19] a étendu cette méthode au comptage direct des plasmas et sérums. L'échantillon à compter (0,1 à 0,4 ml) est mélangé à 1 ml d'Hyamine (solution méthanolique molaire). On ajoute ensuite de 0,5 à 2,5 ml d'éthanol pour permettre la miscibilité avec 5 ml de mélange scintillant (toluène ; PPO ; POPOP).

L'application de ces méthodes à la détermination du tritium dans des tissus ou des fractions cellulaires est aisée, mais il est indispensable de préciser le rendement de la mesure. En effet, la présence dans le milieu d'éthanol et de protéines en quantités variables, entraîne par mauvais transfert de l'énergie et, par absorption d'une partie de la lumière émise, une diminution non négligeable du rendement de comptage. L'introduction d'un témoin interne permet de corriger le résultat.

4) *Comptage de chromatogrammes sur papier*

L'établissement de radiochromatogrammes de composés marqués par le tritium présente un intérêt évident ; cependant, peu de travaux ont été poursuivis dans ce domaine. Ceci tient sans doute aux difficultés inhérentes au comptage du tritium.

MOSES et CALVIN [82] ont comparé les rendements des mesures effectuées avec un compteur à gaz sans fenêtre, et un compteur à scintillation liquide. Avec le premier, l'efficacité est trop faible : le comptage sur papier, sans élution, est fait avec un rendement de 0,26 % ; après élution et préparation d'une coupelle, il atteint 3,48 %.

La scintillation liquide étant donc le seul moyen efficace de compter le tritium, nous avons standardisé une méthode d'élution. Après développement, le chromatogramme est découpé centimètre par centimètre

de l'origine au front ; les bandelettes ainsi obtenues sont éluées directement dans des fioles de comptage numérotées. Le solvant d'élution est éliminé par dessiccation sous vide et le résidu est repris par 0,2 ml d'une solution molaire d'Hyamine.

Les fioles bouchées sont placées quelques heures dans une étuve à 37°. Après refroidissement, 10 ml de mélange scintillant (toluène, PPO, POPOP) sont ajoutés à chaque fiole.

Dans la mesure où l'élution est totale, cette technique est quantitative, elle permet de retrouver par sommation de tous les comptages un nombre de coups égal à celui déposé initialement sur chromatogramme, mais elle est extrêmement laborieuse.

Plusieurs publications récentes [35, 76, 135] proposent d'immerger directement la bandelette de papier dans la fiole de comptage remplie de mélange scintillant. Les modalités techniques varient suivant les auteurs : tantôt ils utilisent des flacons spéciaux maintenant le papier vertical, tantôt ils placent le papier horizontalement au fond des fioles.

Compte tenu du prix de revient élevé du mélange scintillant et de sa consommation importante due au comptage de nombreux chromatogrammes, nous avons essayé de réduire le volume utile pour chaque échantillon. Nous avons constaté que le volume de mélange scintillant n'est pas critique : il suffit d'introduire dans la fiole de comptage assez de liquide pour imbiber la bandelette de papier. Celui-ci acquiert de ce fait une transparence suffisante pour ne pas absorber la lumière émise par le scintillateur. Les bandelettes de papier introduites dans les fioles s'appliquent contre la paroi cylindrique de celles-ci et sont imbibées par 3 ou 4 gouttes de mélange scintillant.

Nous avons vérifié que la dimension du segment de papier ne modifie pas le nombre de coups comptés. Nous avons également établi la validité de la méthode en démontrant sa proportionnalité (*Tableau VI*).

La déviation standard n'est que de ± 3,5 %, y compris l'erreur standard réalisée sur le comptage.

Nous avons pu également calculer le rendement de comptage à partir de ces valeurs : il est de 11,4 % dans le cas d'un papier imprégné et légèrement inférieur à celui du papier immergé (13,2 %).

- Autoradiochromatographie

La faible énergie de rayonnement du tritium est également un obstacle à l'obtention de radioautogrammes suffisamment impressionnés. Plusieurs auteurs ont proposé des palliatifs :

— Moses et Calvin [82] recommandent l'emploi de films sensibles au bleu et d'un procédé d'intensification des images (« toning ») [10], l'exposition durant deux mois.

— Wilson [136] propose de placer le chromatogramme et le film dans un récipient, étanche à la lumière, rempli de solution scintillante.

— Seliger et Agranoff décrivent une méthode que nous avons appliquée avec succès, dans laquelle le chromatogramme imprégné d'anthracène, scintillateur bon marché, est placé contre un film radiologique avec écran [114].

TABLEAU VI

Comptage par scintillation liquide dans différentes conditions de corps marqués par le tritium

Echantillon	*Solution*	*Papier immergé*		*Papier imprégné*	
		trouvé	*calculé*	*trouvé*	*calculé*
1	8.160	5.286		4.203	
2	15.977	10.411	10.572	8.353	8.406
3	24.200	15.393	15.858	13.054	12.609

Influence de la taille du papier

Echantillon	*Surface du papier*	*Coups comptés*
1	2 × 1 cm	4.272
2	3 × 1 cm	4.186
3	5 × 1 cm	4.152

Toutes ces méthodes sont imparfaites, la durée d'exposition et les grandes activités nécessaires pour obtenir une impression convenable des films sont des obstacles qui en limitent l'usage.

5) *Comptage de composés simultanément marqués par* ^{131}I *et par* ^{3}H

L'intérêt que présentent les corps doublement marqués pour des études métaboliques est très grand ; il ne se limite pas à la possibilité de suivre une molécule qui aurait perdu un de ses marqueurs. Par

exemple, l'avantage présenté par la thyroxine marquée à la fois par ^{131}I et par ^{3}H est évident ; grâce à l'iode, il serait possible de suivre la désiodation et grâce au tritium les modifications du squelette carboné. De plus, la présence simultanée sur une molécule de deux isotopes, la détermination de leurs activités spécifiques respectives et de leur rapport constituent des critères d'identification remarquables. En effet, la connaissance des activités en iode radioactif et en tritium d'une thyroxine doublement marquée, permet de vérifier si un de ses métabolites identifié par ses Rf chromatographiques, présente un rapport de ses activités compatible avec la formule qu'on lui attribue. Le désaccord entre le rapport des activités mesurées et celui des activités calculées à partir de la formule développée, permet de conclure d'une manière absolue que ce métabolite n'est pas celui que l'on croyait avoir mis en évidence.

Nous avons donc étudié les possibilités de comptage du rayonnement dû à un seul des deux isotopes présents, à savoir ^{131}I et ^{3}H. Comme il existe de grandes différences entre l'énergie du rayonnement de ^{131}I (0.61 MeV) et celle du rayonnement de ^{3}H (0.018 MeV), nous avons cherché sur le spectromètre à scintillation liquide [1] des conditions permettant la séparation de ces rayonnements.

Nous n'avons pas réussi : il nous a été possible de trouver des conditions pour le comptage exclusif de l'iode, celui du tritium étant toujours faussé par l'interférence d'une partie non proportionnelle du rayonnement de l'iode vraisemblablement due à l'effet Compton. Nous avons donc eu recours à une méthode plus longue, mais à l'abri de ces inconvénients. Cette méthode s'applique essentiellement au comptage de radiochromatogrammes, mais peut être étendue à celui des solutions, moyennant certaines précautions.

On dresse le radiochromatogramme par comptage cm par cm avec un tube de Geiger-Muller qui détecte les radiations β provenant de ^{131}I à l'exclusion de celles de ^{3}H. Ensuite, on attend le temps suffisant pour que le rayonnement de ^{131}I devienne négligeable par suite de la décroissance (demi-vie = huit jours). Lorsqu'on est sûr de la disparition de la radioactivité de l'iode, le plus souvent au bout de 6 à 8 périodes, on procède au comptage de ^{3}H cm par cm, ainsi qu'il a été décrit plus haut.

La confrontation de ces deux radiochromatogrammes, compte tenu des rendements des deux compteurs utilisés et de la décroissance du rayonnement de l'iode entre le jour de la synthèse et le jour de son

---

(1) Packard Tri-Carb.

comptage, permet l'établissement des rapports des activités spécifiques de tous les métabolites présents.

Les rapports sont établis de la manière suivante :

Soit x le rapport des activités spécifiques le jour de la synthèse, pour un composé donné :

$$x = \frac{a}{b} K$$

a = nombre de coups comptés en iode radioactif le jour de la synthèse ;

b = nombre de coups comptés en tritium pour le même échantillon ;

$K = \frac{R_1}{R_2}$ R_1 = rendement du compteur Geiger pour la détermination de l'iode radioactif ;

R_2 = rendement du compteur à scintillation liquide pour la détermination du tritium.

On détermine le rapport des activités spécifiques le jour du comptage de l'iode pour un composé quelconque présent sur le chromatogramme, de la manière suivante :

$$x' = \frac{a'}{b'} KD$$

a' = nombre de coups comptés en un point du chromatogramme avec un tube Geiger ;

b' = nombre de coups comptés en ce même point du chromatogramme avec un scintillateur liquide ;

D = décroissance du rayonnement de l'iode entre le jour de la synthèse et celui du comptage du chromatogramme ($D = 1$ le jour de la synthèse).

Si $x' = x$, le corps qui se trouve en ce point du chromatogramme présente le même rapport d'activité spécifique que le composé initial. Il peut s'agir de celui-ci, s'il a le même Rf, ou d'un autre composé n'ayant perdu ni iode ni tritium.

Si $x' > x$, nous sommes en présence d'un corps nouveau, plus riche en iode ou plus pauvre en tritium.

Si $x' < x$, c'est aussi un corps nouveau, mais plus riche en tritium ou plus pauvre en iode.

Dans ces deux derniers cas, les causes de modification des rapports sont généralement le départ de ^{3}H sous forme d'eau tritiée et celui de ^{131}I sous forme d'iodure.

Dans le cas où les coups comptés correspondent à un incubat total, les rapports peuvent être établis de la manière suivante, plus simplement sans tenir compte de la décroissance de l'iode :

Soient Σa la somme des coups d'iode comptés sur tout le chromatogramme, Σb la somme des coups de tritium comptés sur tout le chromatogramme :

$$\frac{a}{b} = \frac{\Sigma a}{\Sigma b} \text{ ou bien } \frac{a}{b} \gtrless \frac{\Sigma a}{\Sigma b}$$

avec les mêmes conclusions que dans le cas général.

En plus de tous ces renseignements apportés par l'examen des rapports d'activités spécifiques, il est possible d'en tirer des conclusions sur l'homogénéité d'un pic de radioactivité dû à la fois à l'iode et au tritium. Si les rapports sont différents lorsqu'on parcourt tous les points de ce double pic, on peut conclure d'une manière absolue à l'hétérogénéité du matériel qui le compose.

CONCLUSIONS

Le comptage du tritium pose un certain nombre de problèmes résolus différemment, selon qu'il s'agit de mesurer les radioactivités de solutions, de tissus, de chromatogrammes, etc. De plus, la nature même des constituants d'un mélange biologique modifie les conditions qu'il est nécessaire d'adopter et impose diverses corrections.

L'obtention de données comparables au cours d'une manipulation met en œuvre des techniques différentes et exige toute une série de précautions. Nous avons décrit dans ce chapitre les méthodes que nous avons utilisées : il s'agit d'adaptations de techniques décrites ou de procédés nouveaux.

- II -

SYNTHESE DES THYRONINES DES SERIES DE LA THYRONINE ET DE LA IODO-3, THYRONINE

— I —

La thyronine et la iodo-3, thyronine ont été préparées par synthèse totale [36, 46, 49, 103]. Un travail préliminaire décrit une méthode permettant l'isolement de la T_1 après déshalogénation catalytique partielle de la T_2, par l'hydrogène en présence de nickel de Raney. La désiodation totale conduit à la thyronine, T_0 [46, 108]. Ces travaux ont montré que la déshalogénation procède par étapes, comme l'halogénation.

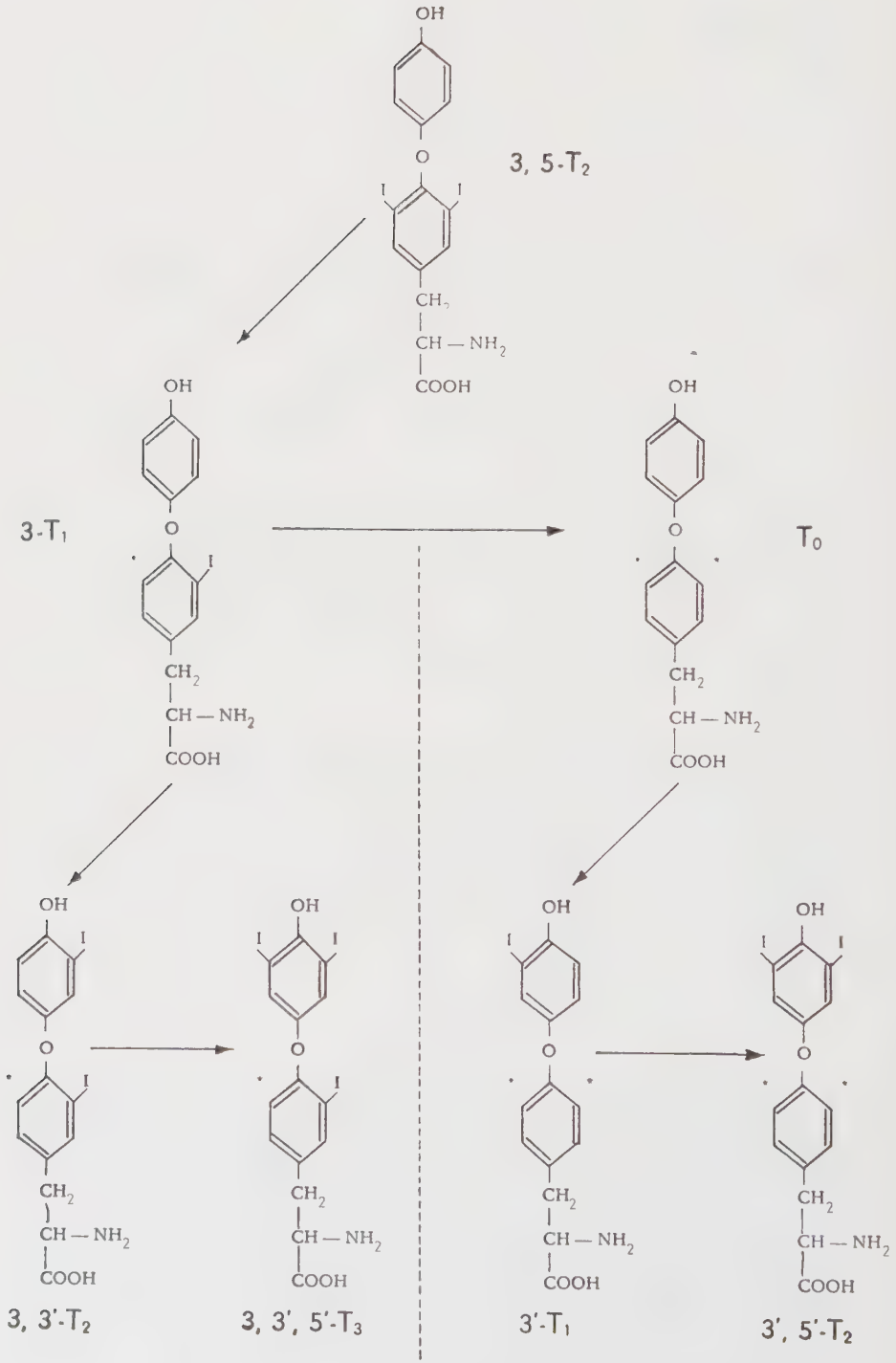
Il nous a paru intéressant d'adapter la méthode de la déshalogénation catalytique, dont la spécificité était bien établie, à la préparation de T_0 et de T_1 marquées par le tritium, ces deux composés nous permettant l'obtention de T'_1 et T''_2, et de T'_2 et T'_3 respectivement. Pour cela, il suffisait de remplacer l'hydrogène par du tritium : les molécules ainsi obtenues devaient être marquées dans les positions laissées vacantes par le départ de l'iode, c'est-à-dire en 3 ou en 3,5 (*Tableau VII*).

1) *Appareillage et mode opératoire*

L'appareil nécessaire à la préparation de T_0 et de T_1 tritiées devait être un modèle pour microhydrogénation, c'est-à-dire ne mettre en œuvre qu'un volume de 1 ml de gaz pour chaque opération ; il devait également permettre de ramener à la pression atmosphérique le tritium livré dans des ampoules scellées sous pression réduite.

Nous avons fait construire au début de ce travail un appareil, analogue à celui décrit par Glascock et Reinius [37], qui remplissait ces deux conditions.

TABLEAU VII



Nous lui avons apporté quelques modifications destinées à faciliter les manipulations et à accélérer la réaction.

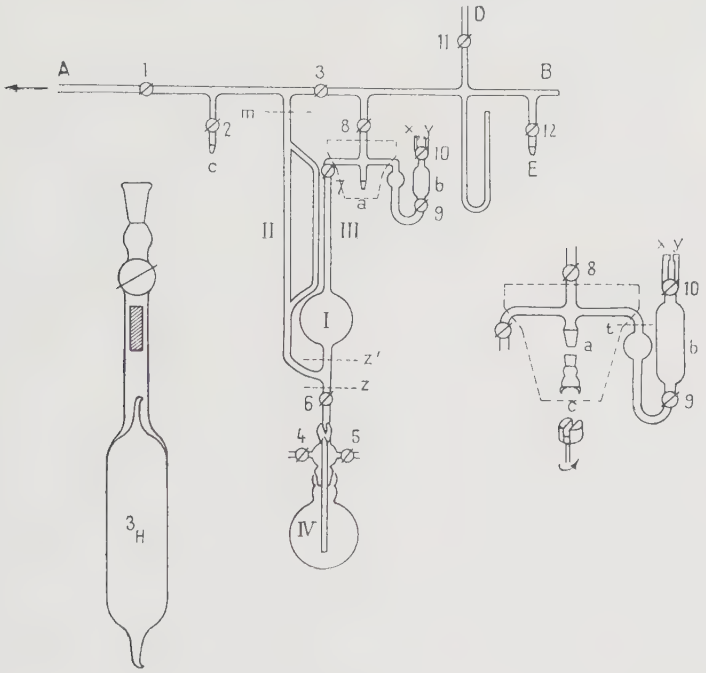


FIGURE 1
Le volume V est délimité par le pointillé

L'appareil comprend (*fig. 1*) :

— une rampe AB reliée en A à une installation de vide (vide primaire à palette et vide secondaire à vapeur de mercure);
— un ajutage C auquel on relie la réserve de tritium ;
— deux ajutages D et E permettant de réaliser une entrée d'air ou un vide par trompe à eau ;
— un dispositif fonctionnant à la fois comme une jauge de Mac Leod et une pompe Toepler :
  — I : boule de la jauge de Mac Leod ;
  — II et III : branches de mesure de la jauge. Le rapport des volumes de la branche III et de la boule I est de 1/250e ;
  — IV : réservoir de mercure ;
— un manomètre de contrôle à mercure F ;
— un dispositif d'hydrogénation ainsi constitué :
  a) ajutage à rodage 00 sur lequel s'adapte la nacelle ;

b) tube en U à boules contenant du mercure et permettant par le jeu du robinet 10 à deux voies, *x* et *y*, de réduire ou d'augmenter le volume V ;

c) nacelle à hydrogéner.

Les manipulations s'effectuent de la manière suivante :

On branche en *a* la nacelle *c* contenant une solution du corps à réduire et le catalyseur : le mélange est congelé par l'azote liquide. On abouche en C la fiole contenant le tritium. On fait le vide dans tout l'appareil par le robinet 1, les robinets 2, 3, 7, 8 étant ouverts et les robinets 6, 9, 11, 12 étant fermés. Le vide est mesuré avec la jauge de Mac Leod, en fermant 7, puis en ouvrant 6 de façon à ce que le mercure qui se trouve au niveau *z*, s'élève dans les branches II et III. La différence de niveau entre les deux branches donne la mesure du vide. Lorsque le vide désiré est obtenu (10^{-6} mm Hg), on ferme 1, 2, 3, 7, 8 et on fait monter le mercure jusqu'au niveau *m*.

Le scellement de l'ampoule est alors brisé au moyen d'un aimant avec lequel on élève et laisse retomber un morceau de fer doux emprisonné à l'intérieur. Le tritium est introduit dans l'appareil par une ouverture de 2. On ferme 2 et on ramène le mercure au niveau *z* en ouvrant 6 et en faisant le vide en 5 au moyen d'une trompe à eau. Le gaz occupe alors le volume compris entre 1, 2, 3, 7 et le niveau *z*. On ferme 5 et on ouvre 4 (en relation avec l'atmosphère), 6, 7 : on laisse le mercure remonter jusqu'à 7. Le gaz est ainsi transféré dans le volume V que l'on a augmenté au maximum en aspirant par *x* le mercure contenu dans la boule de *b*. On ferme 7.

Cette opération de transfert est répétée trois fois, c'est-à-dire jusqu'à ce que la jauge de Mac Leod mesure une pression résiduelle de tritium de l'ordre de 10^{-5} mm Hg dans le volume délimité par 1, 2, 3, 7 et le niveau *z*. Au moyen des robinets 9 et 10, on renvoie le mercure dans la boule de *b* jusqu'au niveau *t*, ce qui a pour effet de ramener le volume du gaz à 1 ml et d'exercer une légère surpression dans la nacelle. La solution du corps à hydrogéner est décongelée.

Pour accélérer la réaction, nous avons adapté un micro-agitateur magnétique sous le fond plat de la nacelle *c*. A l'intérieur de celle-ci, nous avons placé un micro-barreau constitué par une limaille de fer gainée de verre.

On peut suivre la marche de l'hydrogénation de la manière suivante : on congèle la nacelle *c* et on ramène dans I et III le tritium contenu dans V en abaissant le niveau du mercure à *z'*. Après fermeture de 7, la branche III est mise en communication avec l'atmosphère, le volume de gaz est mesuré par la différence de niveau du mercure entre II et III.

Si la réduction n'est pas terminée, le tritium est renvoyé en V par ouverture de 7. Dans le cas contraire, on introduit de l'air en V par 11 et 8. Pour traiter des quantités de produit plus importantes, nous avons conçu un appareil plus simple d'emploi, comportant un nombre plus réduit de robinets, pour limiter les fuites inévitables. Par ailleurs, nous avons augmenté le volume de la nacelle et prévu une agitation plus efficace (*fig. 2*).

L'ampoule de tritium est scellée sur le robinet 2 qui est à deux voies, l'une *v* communiquant avec un réservoir à mercure B, l'autre *w* avec un capillaire conduisant à la nacelle à hydrogéner D et au robinet 1. Ce dernier porte un rodage femelle C.

Les manipulations sont les suivantes : la solution du corps à réduire et le catalyseur sont introduits dans la nacelle et congelés par l'azote liquide. On place l'appareil sur une rampe à vide, on ouvre 1 et on place 2 sur la voie *w*. Le vide réalisé, on ferme 1 et on sépare l'appareil de la rampe. On brise le scellement de l'ampoule A de la même manière que précédemment : le tritium se répand dans l'appareil. On le comprime dans D entre 1 et 2, en remplissant A avec le mercure contenu dans B. Lorsque tout le tritium a été chassé dans D, on décongèle le mélange et on place l'appareil sur un agitateur à secousses. A la fin de la réduction, le mélange est congelé de nouveau et l'excès de tritium éliminé en abouchant le rodage C sur le rodage *a* de l'appareil précédent.

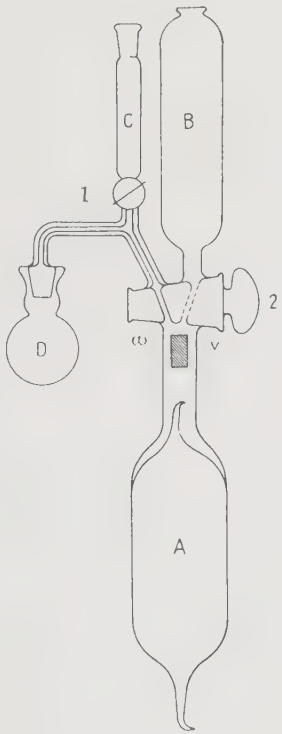


FIGURE 2

Pour toutes nos réductions, nous avons utilisé du nickel de Raney préparé selon DELÉPINE et HOREAU [23], qui fonctionne sous la pression atmosphérique et même sous une légère dépression. Pour éviter une diminution d'activité spécifique dans les produits de déshalogénation, due à la présence d'hydrogène non radioactif à l'intérieur du catalyseur, il est nécessaire de réduire la quantité de celui-ci au maximum et même de dégazer en plaçant sa suspension congelée sous vide.

L'emploi du nickel de Raney impose l'usage d'un solvant alcalin à tension de vapeur élevé, qui doit, par ailleurs, sous un petit volume, dissoudre parfaitement les produits à réduire. Nous avons arrêté notre choix sur la soude 1 N ou le dioxane saturé de soude 1 N, suivant la nature des solutés.

2) *Préparation de la T_1 et de la T_0*

Le volume de gaz utile lors d'une manipulation étant de 1 ml, c'est sur la quantité de T_2 soumise à l'hydrogénation qu'il faut jouer pour avoir une réaction partielle ou totale.

Si l'on désire obtenir exclusivement T_0, il faut que la quantité de T_2 soit légèrement en défaut par rapport à la stoechiométrie. L'obtention de T_1 se fait dans des conditions voisines de la théorie ; cependant, à la fin de la réaction, on se trouve toujours en présence d'un mélange de T_2, T_1 et T_0 qu'il convient de séparer.

Nous allons envisager un tel cas, le plus compliqué : nous utiliserons 15 mg de iodo-3-5, L-thyronine, soit une quantité intermédiaire ; en effet, pour le départ d'un atome d'iode, il faudrait 23,4 mg, et pour celui de deux, 11,7 mg.

Les 15 mg de T_2 sont placés dans la nacelle et dissous dans 50 μl de NaOH N. Les manipulations s'effectuent alors comme il a été dit dans le mode opératoire. Lorsqu'une mesure de volume montre que la totalité du tritium mis en œuvre a été consommée, le mélange est transféré dans un petit tube à centrifuger. Après élimination du nickel, il est acidifié par HCl N. Le précipité obtenu est lavé dans de petits volumes d'eau et séché. On le dissout dans l'ammoniaque et on le chromatographie dans le solvant butanol secondaire-NH_4OH conc. (3-1) [11]. On sépare ainsi très bien T_0 (Rf = 0,65) de T_1 (Rf = 0,80) et de T_2 (Rf = 0,82).

Après élution par l'ammoniaque au tiers, T_1 est débarrassée de T_2 résiduelle par une chromatographie dans le solvant n-butanol saturé de NH_4OH 2 N. Quand on désire obtenir uniquement T_0, on désiode totalement T_2 par un excès de tritium. Si les quantités sont suffisantes, T_0 est purifiée par plusieurs précipitations.

3) *Critères d'identité et de pureté de T_0*

T_0 est étudiée par diverses méthodes analytiques dans le but de s'assurer de son identité, de sa pureté et de mesurer son activité spécifique.

a) Chromatographie sur papier

T_0 en solution ammoniacale est analysée par chromatographie dans divers solvants, acides, neutres et alcalins. Ses différents Rf sont déterminés :

Par des réactions colorées

— Réactif de Pauly [15] : réaction positive montrant la présence d'une fonction phénol.
— Ninhydrine : réaction positive montrant le groupement α-aminé du reste alanine.
— Sulfate cérique : arsénite de sodium [16]. Cette réaction est négative et confirme qu'il s'agit bien de T_0.

Par comptage

Les radiochromatogrammes sont établis par la méthode qui a été décrite et discutée précédemment.

On constate que les pics de radioactivité recouvrent parfaitement les taches révélées colorimétriquement (*fig. 3*).

Les Rf obtenus sont :
— n-butanol : acide acétique : eau (78 : 5 : 17). Rf = 0,70 ;
— méthanol : acétate d'ammonium 0,2 M (1 : 2,5). Rf = 0,61 ;
— n-butanol saturé de NH_4OH 2 N. Rf = 0,50.

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature.

b) Spectrographie ultra-violette

Nous avons établi le spectre d'absorption [1] dans l'ultra-violet de la thyronine tritiée : il présente un maximum d'absorption pour la longueur d'onde 295 mμ caractéristique de cette substance (*fig. 4*).

c) Dosage et activité spécifique

La quantité de thyronine tritiée présente dans un éluat de chromatogramme est dosée par report du coefficient d'extinction à la longueur d'onde 295 mμ sur une courbe établie au moyen d'une gamme de solutions témoins dont la concentration varie de 5 μg à 80 μg (*fig. 4*). Une partie aliquote de l'éluat est comptée au compteur à scintillation liquide [2] dans le mélange toluène-alcool (90-10). L'activité spécifique a été calculée et comparée à la valeur théorique déduite

(1) Beckman DK1.
(2) Packard Tri-Carb.

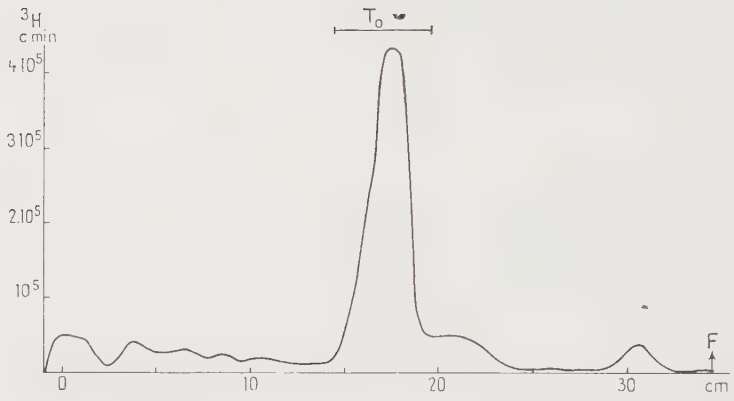


FIGURE 3

Radiochromatogramme de T_0 brute marquée par ^{3}H.
Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

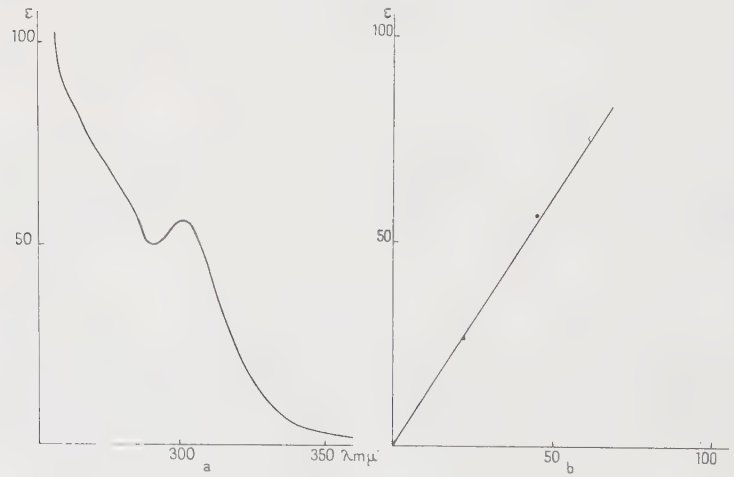


FIGURE 4

a) Spectrogramme U.V. de T_0 en solution dans NaOH 0,1 N

b) Absorption à 295 mμ de solutions sodiques de T_0 en fonction de leur concentration

de la richesse de l'hydrogène utilisé pour la déshalogénation en son isotope ^{3}H. La comparaison de ces deux nombres montre leur concordance.

4) *Critères de pureté de T_1*

Ce sont les mêmes que ceux de T_0, mais comme T_1 ne présente pas d'intérêt biologique, nous nous sommes servi de ce corps pour préparer T'_2 et T'_3 qui sont des iodothyronines naturelles.

T'_2 et T'_3 sont préparées par action d'une solution alcoolique d'iode sur T_1 en solution ammoniacale. L'iodation s'effectue en deux étapes. Si l'on utilise un mélange $^{127}I + {}^{131}I$, on obtient T'_2 et T'_3 doublement marquées.

Ainsi que prévu, l'activité spécifique molaire qui est la moitié de celle de T_0, n'est pas modifiée par l'iodation subie par T_1.

II. — APPLICATIONS DE LA MÉTHODE A LA SYNTHÈSE D'AUTRES CORPS

La méthode de tritiation catalytique que nous avons mise au point, pour la préparation de T_1 et de T_0, a été appliquée à d'autres corps. Ainsi nous avons effectué le marquage de la monoiodotyrosine et de la tyrosine à partir de la diiodotyrosine, et de l'œstradiol à partir du diiodoœstradiol.

1) *Préparation de MIT et de Tyr tritiées en 3 et 3,5*

Par action de l'hydrogène en présence de nickel Raney, la iodo-3-5, tyrosine (DIT) se désiode en deux étapes pour donner naissance à la iodo-3 tyrosine (MIT), puis à la tyrosine (Tyr).

L'utilisation d'un mélange gazeux contenant l'isotope ^{3}H de l'hydrogène, permet la préparation de MIT et de Tyr, marquées respectivement dans les positions 3 et 3-5.

Nous nous sommes volontairement placés dans des conditions expérimentales telles que la réduction soit incomplète, pour nous trouver finalement en présence d'un mélange de MIT et de Tyr, marquées, souillé de DIT non marquée.

19 mg de DIT sont introduits dans la nacelle et dissous dans 50 μl de NaOH N en présence de nickel de Raney ; la réduction est effectuée par 1 ml de gaz ramené à la pression atmosphérique. Lorsque

tout le gaz a été absorbé, le nickel est éliminé par centrifugation et le surnageant est acidifié par HCl N. Le précipité est centrifugé, lavé à l'eau et séché. Le mélange obtenu est fractionné par chromatographie sur papier, dans le solvant n-butanol : acide acétique : eau (78 : 5 : 17). Les Rf des trois constituants sont les suivants : DIT Rf = 0,55 ; MIT Rf = 0,40 ; Tyr Rf = 0,18. Le repérage de la position des corps tritiés s'effectue par comptage cm par cm et par révélation à la ninhydrine. Les bandes correspondant à la fois à la position des pics de radioactivité et des taches colorées sont éluées par du méthanol à 1 % d'ammoniaque.

La MIT et la Tyr, provenant de l'évaporation de ces éluats, ont été identifiées et dosées par spectrographie ultra-violette après mise en solution dans NaOH 0,1 N (*fig. 5* et *6*).

Le comptage de la radioactivité de parties aliquotes de ces solutions a permis de vérifier que les activités spécifiques théoriques avaient été obtenues.

Nous avons fait une expérience supplémentaire pour préciser la position des atomes de tritium sur le squelette carboné, et démontrer qu'ils n'occupent que les positions 3 et 3,5. Des solutions ammoniacales de MIT et de Tyr tritiées ont été traitées par des solutions alcooliques d'iode respectivement à 3 et 6 atomes. La DIT ainsi préparée, ne présente plus de radioactivité.

2) *Préparation de l'œstradiol marqué par le tritium*

Le cycle A de l'œstradiol étant un cycle benzénique, le groupement hydroxyle en 3 se comporte comme un phénol. C'est-à-dire qu'il est susceptible de fixer l'iode en deux temps, donnant naissance en un premier temps au monoiodoœstradiol et en un second temps au diiodoœstradiol [2]. Si la nature du diiodoœstradiol est bien définie, les atomes d'iode se trouvant placés dans les positions 2-4 du cycle A, celle du monoiodoœstradiol n'a pas été précisée ; en effet, on ne sait pas s'il s'agit du 2- ou du 4-iodoœstradiol. En l'absence de séparation chromatographique de ces deux isomères, nous nous sommes limités à la préparation du 3-5-diiodoœstradiol pour lequel il n'existait pas d'équivoque.

Pour obtenir exclusivement du diiodoœstradiol, l'iodation a été effectuée dans le rapport de 6 atomes d'iode pour une molécule d'œstradiol. 21,76 mg d'œstradiol en solution dans un mélange à parties égales de méthanol et d'ammoniaque concentrée sont traités par une solution alcoolique d'iode contenant 61 mg. Le solvant est évaporé par distillation sous pression réduite et le résidu de diiodo-

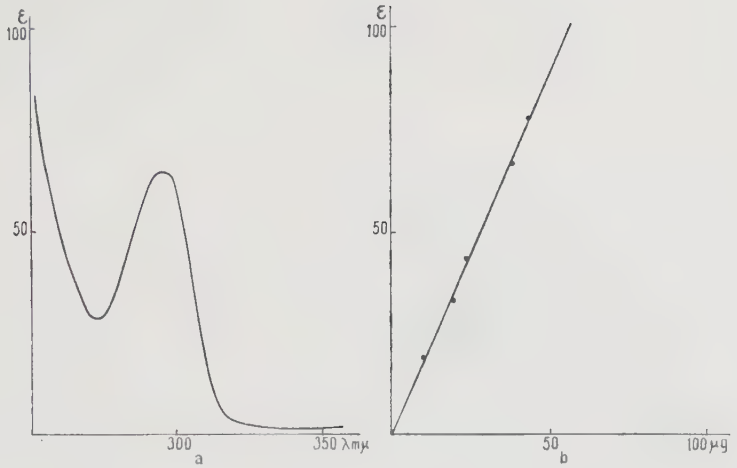


FIGURE 5

a) Spectrogramme U.V. de Tyr en solution dans NaOH 0,1 N

b) Absorption à 295 mμ de solutions sodiques de Tyr en fonction de leur concentration

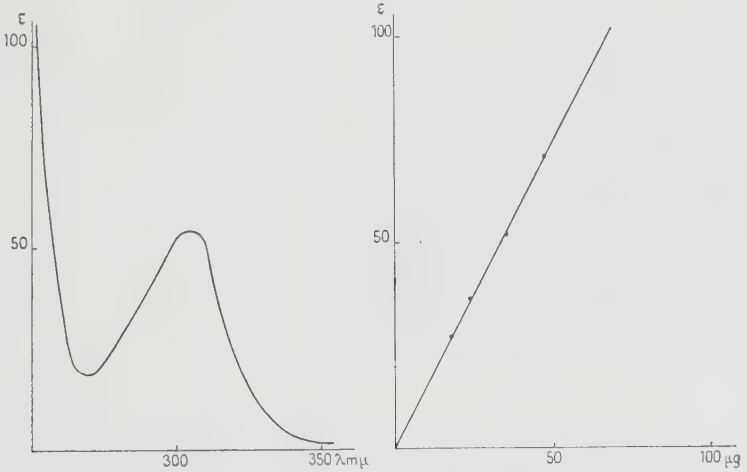


FIGURE 6

a) Spectrogramme U.V. de MIT en solution dans NaOH 0,1 N

b) Absorption à 304 mμ de solutions sodiques de MIT en fonction de leur concentration

œstradiol est lavé plusieurs fois à l'eau. Le rendement en produit brut est de 69 %. Après purification sur colonne d'alumine, l'iode est dosé : sa teneur est en accord avec la théorie, à savoir 48 %. Pour la suite de notre travail, nous avons dû mettre au point un nouveau

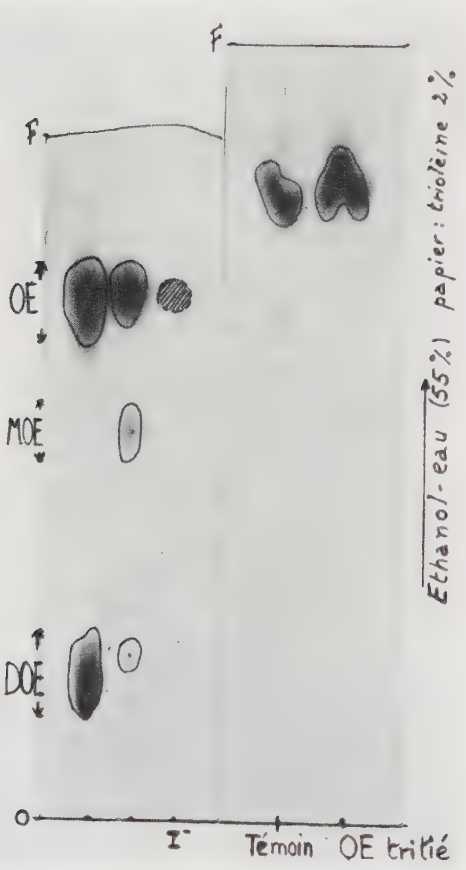


FIGURE 7

a) Séparation de l'œstradiol (ŒE), du monoiodoœstradiol (MŒE), du diiodoœstradiol (DŒE) et de l'iodure dans le solvant éthanol-eau (55, 45) sur papier traité par une solution de trioléine à 2 % dans le benzène

b) Identification de l'œstradiol tritié obtenu par hydrogénation catalytique du diiodoœstradiol, par révélation au bleu de Turnbull

solvant chromatographique permettant une bonne séparation d'un mélange contenant à la fois l'œstradiol et ses dérivés mono et diiodés. Le système utilisé est du type à phase inversée : le papier Whatman n° 1 est immergé dans une solution à 2 % de trioléine dans le benzène, essoré dans du papier filtre puis séché à l'air [115]. Le solvant utilisé est l'éthanol aqueux (55/45) saturé de trioléine. Les corps séparés sont révélés par pulvérisation du mélange extemporané, volume à

volume, d'une solution à 1 % de chlorure ferrique avec une solution à 1 % de ferricyanure de potassium [8]. Les chromatogrammes sont lavés à l'acide chlorhydrique dilué et à l'eau, puis séchés. Les taches apparaissent colorées en bleu de Turnbull sur fond bleu très clair. Les Rf sont les suivants : œstradiol Rf = 0,75 ; monoiodoœstradiol Rf = 0,58 ; diiodoœstradiol Rf = 0,23 (*fig. 7a*).

L'iodure, qui se révèle également en bleu par le même réactif, occupe un Rf égal à 0,67.

13 mg de diiodoœstradiol sont dissous dans la nacelle de l'appareil par 50 μl de dioxane saturé de soude N et réduits en présence de nickel Raney par un mélange isotopique $^1H_2$: $^3H_2$ (5/95).

Après absorption du volume de gaz disponible, le nickel est séparé par centrifugation et le produit réactionnel précipité par de l'acide chlorhydrique dilué. Après lavage à l'eau, l'insoluble est analysé par chromatographie sur papier dans les conditions décrites plus haut. La révélation et le comptage des pistes chromatographiques montrent la présence d'un seul constituant : l'œstradiol, la réduction ayant été complète (*fig. 7b*). Une identification supplémentaire et le dosage ont été réalisés par spectographie ultra-violette dans la gamme de longueur d'onde s'étendant de 261 à 300 mμ [33]. L'œstradiol tritié est dissous dans l'éthanol et comparé avec une série de témoins dont la concentration varie de 5 à 75 μg/ml. L'activité spécifique est égale au rapport entre le comptage réalisé sur une aliquote de cette solution et la concentration trouvée. La valeur expérimentale est identique à celle calculée d'après la teneur du gaz en isotope radioactif ; elle correspond à la fixation de deux atomes de tritium par molécule d'œstradiol.

III. — EXTENSIONS POSSIBLES DE LA MÉTHODE

Les diverses préparations que nous avons ainsi réalisées montrent bien la généralité de la méthode. La synthèse de phénols marqués par le tritium avec une haute activité spécifique est effectuée par réduction catalytique de leurs dérivés iodés. Par exemple nous pouvons préparer également T_0 marquée en d'autres positions, en prenant comme substrat de désiodation une autre iodothyronine. Par exemple T''_2 conduit par l'intermédiaire de T'_1 à T_0 marquée dans les position 3'5'. Le dérivé acétique de T_0, l'acide thyroacétique peut être de même obtenu marqué en des positions diverses. La douceur des réactions et le fait qu'elles ne sont pas racémisantes [17], permettent d'envisager leur application au marquage par le tritium de peptides et de petites protéines doués d'activité biologique, tels que l'ocytocine, la vasopressine et le glucagon. Par ailleurs toute une série de dérivés

aromatiques, dont la déshalogénation catalytique a été décrite [31], peuvent également être tritiés de cette manière.

Malgré le large champ d'application de cette méthode, il n'est, par définition, pas possible de l'utiliser pour la préparation de la thyroxine marquée, qui est une thyronine complètement iodée. Il est de même impossible de s'en servir pour l'obtention de la 3, 5, 3' triiodothyronine ; en effet par désiodation chimique des iodothyronines, on a montré que les atomes d'iode qui occupent les positions 3, 5 sont plus labiles que ceux placés en 3', 5' [109]. L'action du tritium sur la thyroxine ne peut donc conduire à la formation de triiodo 3, 5, 3' thyronine marquée ; aussi avons-nous mis au point une autre méthode, spécialement adaptée à la synthèse de ces deux thyronines, marquées par le tritium.

- III -

SYNTHESE DES THYRONINES DE LA SERIE DE LA IODO-3, 5, THYRONINE

— I —

Il n'était pas raisonnable d'envisager une synthèse totale, utilisant un composé marqué par le tritium, en effet quelle que soit la méthode de synthèse de T_2 utilisée, les étapes sont nombreuses et le rendement final n'est pas excellent.

Dans la synthèse décrite par HARINGTON et BARGER [48], la iodo-3,5, thyronine (T_2) est obtenue par traitement à reflux du iodo-3,5, (méthoxy-4', phénoxy-)4. α-benzamidocinnamate d'éthyle avec une solution d'acide iodhydrique à 57 %.

Cette seule opération déméthoxyle, désestérifie, débenzoyle et réduit la double liaison sans désioder.

Un traitement identique par de l'acide iodhydrique tritié doit permettre de préparer la T_2 marquée par le tritium (*Tableau VIII*).

1) *Préparation de l'acide iodhydrique tritié*

MAQUENNE a publié en 1893 une méthode de préparation de l'acide iodhydrique par action de l'eau sur un excès d'iode métalloïdique pulvérisé en présence de phosphore rouge, à reflux [78]. A la fin de la réaction, l'azéotrope est séparé par distillation.

Pour éviter la formation d'iodure de phosphonium, M. ADAMS [1] a proposé de refroidir le mélange pendant une demi-heure, avant de le porter à l'ébullition. Une telle méthode se prête donc tout à fait à la préparation de l'acide iodhydrique tritié : en effet, il suffit de remplacer l'eau par de l'eau tritiée.

Il devenait alors nécessaire de diminuer les volumes, de réduire au minimum les manipulations et de supprimer la distillation. Aussi avons-nous mis au point une préparation directe de l'azéotrope en augmentant le volume de l'eau.

150 mg d'iode et 18 mg de phosphore sont introduits dans un petit ballon à rodage de capacité 2 ml. On verse sur ce mélange, à l'aide d'une seringue, 0,150 ml d'eau tritiée. Le ballon est alors adapté à un réfrigérant à reflux muni d'une garde à potasse caustique. On maintient le mélange pendant trente minutes à basse température (0-5°C). Au bout de ce temps, on porte à ébullition la suspension qui se décolore. Nous avons contrôlé sur une préparation témoin par titration à la soude, avant et après distillation, la formation de la quantité théorique d'acide iodhydrique à 57 %.

2) *Préparation de la T_2 tritiée*

On introduit le corps (I) (*tableau VIII*) dans le ballon contenant l'acide iodhydrique tritié, préparé comme il a été décrit précédemment, et l'on maintient le mélange à ébullition pendant une heure et demie.

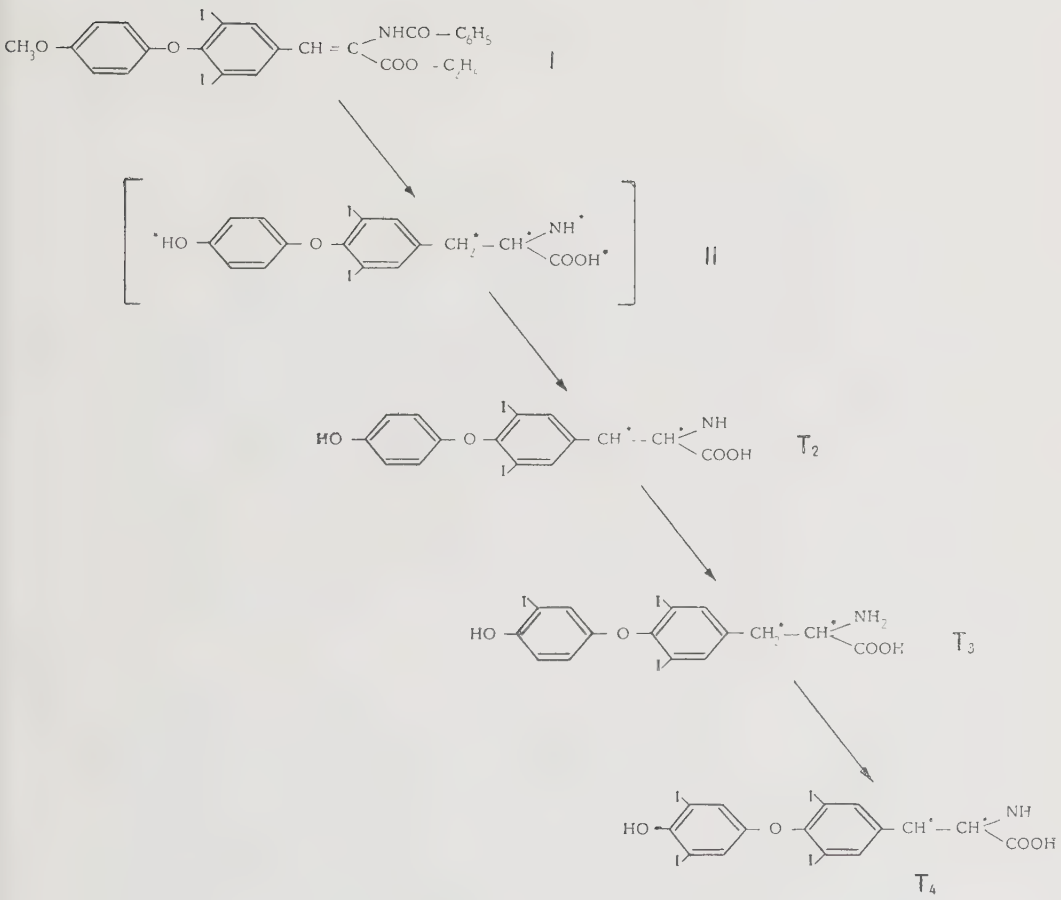
Au bout de ce temps, on évapore l'acide iodhydrique à la température du laboratoire en plaçant le ballon dans un dessiccateur sous vide en présence d'anhydride phosphorique et de potasse caustique. Le résidu sec est repris par la soude normale. La solution est centrifugée pour éliminer le phosphore rouge, le surnageant est acidifié à pH = 3 par l'acide chlorhydrique normal : un précipité du corps (II) se forme. Il est séparé par centrifugation, lavé à l'eau et séché. Après redissolution dans l'ammoniaque et élimination d'un insoluble, l'iodothyronine est précipitée à pH = 3. Une purification supplémentaire par l'intermédiaire du chlorhydrate et un lavage à l'éther sont effectués dans les conditions décrites par Harington et Barger [48].

Le produit sec obtenu a fait l'objet des déterminations suivantes dans le but de s'assurer de sa nature et de sa pureté.

3) *Critères de pureté*

Bien que la réaction que nous avons utilisée soit bien connue, il nous a cependant paru nécessaire de vérifier la nature et la pureté du composé obtenu. Celui-ci étant radioactif, il était exclu d'effectuer sur lui un dosage d'iode ou de le soumettre à l'analyse élémentaire. Nous avons fait appel à d'autres critères.

TABLEAU VIII



a) Chromatographie sur papier

Le produit purifié par l'intermédiaire du chlorhydrate a été analysé par chromatographie sur papier. Les chromatogrammes ont été développés dans les solvants suivants :

— Solvant n° 1 : *n*-butanol, saturé d'ammoniaque 2 N.
— Solvant n° 2 : pentanol tertiaire saturé d'ammoniaque 2 N.
— Solvant n° 3 : *n*-butanol, acide acétique, eau (78 : 5 : 17).

La révélation des chromatogrammes a été effectuée au moyen des réactifs suivants :

— Réactif de Pauly [15] (sulfanilamide diazoté par le nitrite de sodium). Cette réaction est caractéristique des phénols.
— Ninhydrine. Réactif des α-amino-acides.
— Sulfate cérique. (Réactif de Bowden et Mac Lagan [16].) Réactif de l'iode minéral et organique.

Ces trois réactions ont été positives, ce qui est en accord avec la formule présumée du composé que nous avons préparé.

Nous avons également détecté le produit de la synthèse sur les chromatogrammes par comptage de la radioactivité due au tritium. L'observation de ces tracés (*fig. 8*) montre que la radioactivité est rassemblée en des points des chromatogrammes. Nous avons pu calculer les Rf à partir des spots colorés des chromatogrammes révélés et des pics de radioactivité visibles sur les chromatogrammes.

Les valeurs obtenues sont tout à fait concordantes et parfaitement en accord avec celles fournies par la littérature. En effet, nous avons calculé les valeurs suivantes : Rf = 0,67 dans le solvant n° 1 ; Rf = 0,50 dans le solvant n° 2 ; Rf = 0,65 dans le solvant n° 3.

b) Spectrographie ultra-violette

Nous avons déterminé le spectre de la 3,5 diiodothyronine tritiée au moyen d'un spectromètre Beckman enregistreur, modèle DK. La T_2 est éluée d'un chromatogramme par une solution de soude N/10. On mesure la densité optique de cet éluat dans une gamme de longueurs d'onde allant de 360 à 245 mμ. Le spectrogramme obtenu correspond à celui décrit dans la littérature pour T_2 [7, 64] et présente en particulier les deux maxima caractéristiques à 287 et 302 mμ (*fig. 9*).

c) Activité spécifique

Les spectrogrammes ultra-violets nous ont apporté des renseignements sur la nature du composé préparé et nous ont permis de le doser. Pour cela, nous avons établi les spectres de T_2 témoin dans

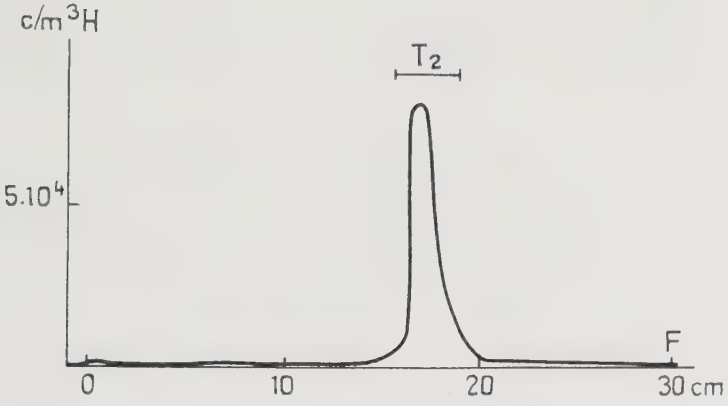


FIGURE 8
Radiochromatogramme de T_2 brute marquée par ^3H
Solvant : pentanol tertiaire saturé d'ammoniaque 2 N

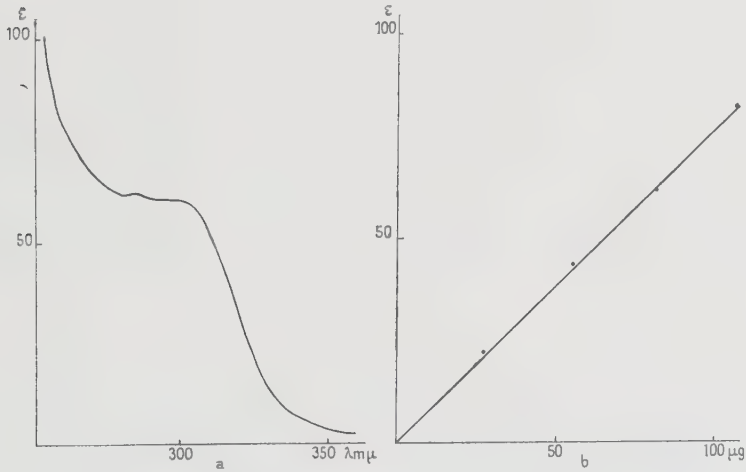


FIGURE 9
a) Spectrogramme U.V. de T_2 en solution dans NaOH 0,1 N
b) Absorption à 302 mμ de solutions sodiques de T_2 en fonction de leur concentration

une gamme de concentration allant de 10 à 130 μg/ml. Nous avons tracé la courbe de la densité optique en fonction de la concentration (*fig. 9*). Pour connaître l'activité spécifique, on mesure la concentration d'une solution de T_2 tritiée par report de sa densité optique à 287 mμ ou à 302 mμ, puis l'on compte la radioactivité d'une aliquote de celle-ci.

L'activité spécifique ainsi déterminée est, à la précision près des mesures, celle calculée pour deux atomes de tritium pour une molécule de T_2. Une telle observation est intéressante ; en effet, sur les cinq atomes de tritium théoriquement fixés par le traitement à l'acide iodhydrique, deux seulement ont résisté aux différents agents chimiques utilisés au cours de l'isolement de T_2 à partir du mélange réactionnel (*Tableau VIII*).

d) Stabilité et position des atomes de tritium

Nous avons vérifié la constance de l'activité spécifique par une méthode de dilution isotopique : on prépare le chlorhydrate [48] par chauffage à ébullition dans une solution d'acide chlorhydrique dilué, d'un mélange de T_2 marquée par ^3H et de T_2 entraîneur (100 mg). On mesure l'activité spécifique du chlorhydrate qui précipite par refroidissement. Puis on le décompose par la soude et on mesure l'activité spécifique de l'iodothyronine libérée. On répète cette opération cinq fois et l'on constate que l'activité spécifique reste constante malgré ce traitement assez drastique entraînant une variation de pH de 1 à 10.

Les deux positions où le tritium est stable peuvent être aisément déterminées : il ne peut s'agir que des atomes liés aux carbones α et β du reste alanine. En effet, les atomes de tritium portés par le carboxyle et l'oxygène phénolique sont libérés par salification à la soude, quant à celui porté par l'azote aminé, il est sûrement éliminé par la préparation du chlorhydrate.

e) Iodation

En solution ammoniacale, T_2 purifiée ou non par chromatographie, traitée par de l'iode en solution alcoolique, fixe un, puis deux atomes d'halogène, pour donner naissance respectivement à la triiodothyronine et à la thyroxine.

Nous avons préparé ces deux corps et nous les avons identifiés de la même manière que T_2 : chromatographie sur papier et spectrographie en ultra-violet [64].

La formation de T_3 et de T_4 tritiées à partir de T_2 tritiée dont nous avons décrit la préparation, constitue une preuve supplémentaire de sa nature et de sa pureté.

4) *Préparation de T_3 et de T_4 tritiées*

L'iodation de T_2 est réalisée dans les conditions classiques, maintes fois décrites [64, 71]. Par iodation partielle à trois atomes d'iode, on obtient T_3 ; par iodation totale à huit atomes, on prépare T_4.

Les produits réactionnels sont déposés sur des chromatogrammes préparatifs. La purification de T_4 est aisée ; en effet, l'iodation étant totale, le milieu réactionnel ne contient pratiquement plus ni T_2, ni T_3 ; de plus, les Rf de celles-ci dans les solvants *n*-butanol : NH_4OH 2 N et tert.-pentanol : NH_4OH 2 N, sont fort différents de ceux de T_4.

Il n'en est malheureusement pas de même pour T_3. Celle-ci est toujours souillée de T_2 ou de T_4, parfois des deux à la fois. T_4 est facile à éliminer, mais pour séparer T_3 de T_2, il a été nécessaire de mettre au point un solvant nouveau. Le mélange tert.-butanol : NH_4OH concentrée dans les proportions 2-1 nous a fourni une bonne séparation.

Dans ces conditions, les pics de radioactivité dus à T_2 et à T_4, déterminés par comptage cm par cm, correspondent parfaitement aux taches des corps témoins révélés colorimétriquement (*fig. 10*). La T_3 et la T_4 éluées des chromatogrammes après développement dans les solvants appropriés, ont été caractérisées et dosées par spectrographie dans l'ultra-violet. Nous avons retrouvé les maxima d'absorption caractéristiques de ces deux substances, soit 317 mμ pour T_3 et 324 mμ pour T_4 (*fig. 11* et *12*). Nous avons calculé les activités spécifiques. A partir d'une T_2 possédant une activité spécifique de 190 μC/mg, nous avons obtenu une T_3 et une T_4 avec les activités respectives suivantes : 153 et 128 μC/mg. Ces chiffres sont tout à fait cohérents ; en effet, si l'on calcule l'activité spécifique par millimole, on trouve la même valeur, soit 99,6 mC.

5) *Préparation de la T_3 et T_4 doublement marquées par ^3H et ^{131}I*

Quand on utilise pour l'iodation de T_2 déjà marquée par ^3H en α-β un mélange de ^{127}I et ^{131}I, on obtient des corps doublement marqués. Etant donné les difficultés du double comptage que nous avons exposées précédemment, T_3 et T_4 ainsi obtenues sont utilisées comme si elles n'étaient marquées qu'à l'iode. Par exemple, leur migration chromatographique dans divers solvants est déterminée par comptage de ^{131}I. Lorsqu'un nombre de périodes suffisant s'est écoulé, l'iode n'est plus radioactif, le tritium peut alors être compté sans pertur-

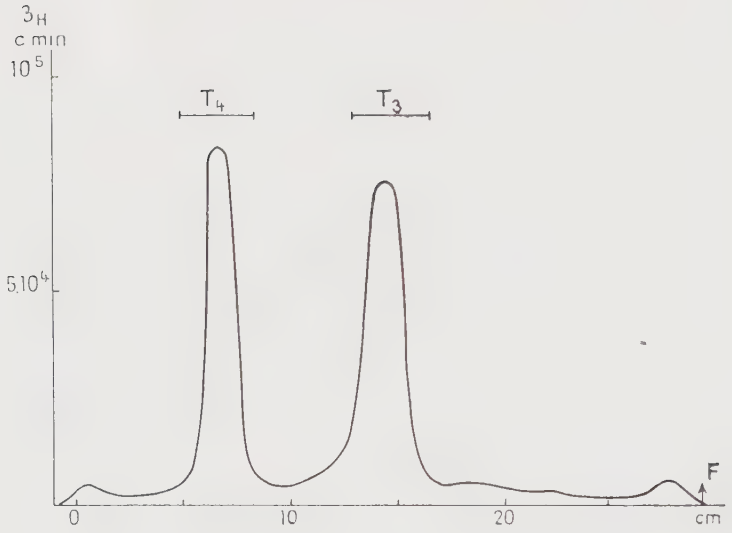


FIGURE 10

Radiochromatogramme d'un mélange de T_3 et de T_4 tritiées dans le solvant pentanol tertiaire saturé d'ammoniaque 2 N

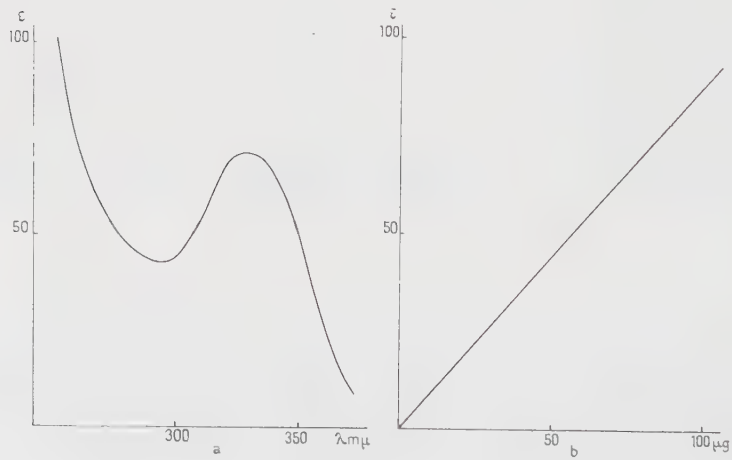


FIGURE 11

a) Spectrogramme U.V. de T_4 en solution dans NaOH 0,1 N

b) Absorption à 324 mμ de solutions sodiques de T_4 en fonction de leur concentration

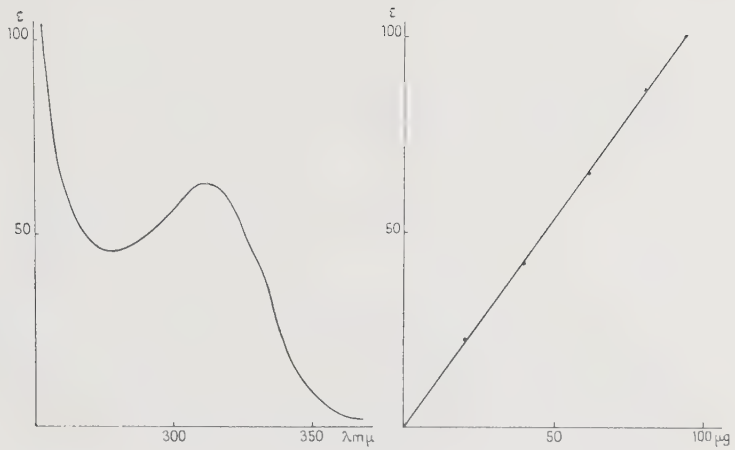


FIGURE 12

a) Spectrogramme U.V. de T_3 en solution dans NaOH 0,1 N

b) Absorption à 317 mμ de solutions sodiques de T_3 en fonction de leur concentration

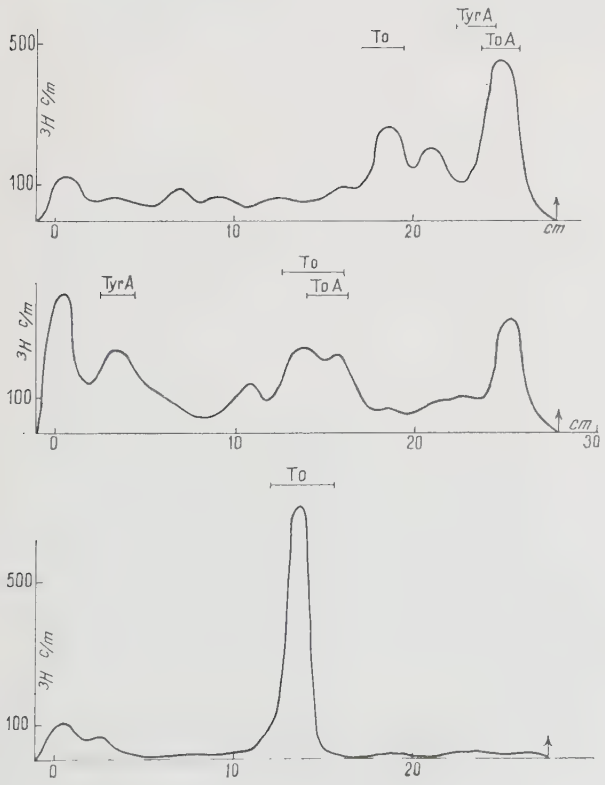


FIGURE 13

Radiochromatogrammes des produits de radio-décomposition de T_0

a) Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17). A comparer avec la *figure 3*

b) Solvant : pentanol tertiaire saturé d'ammoniaque 2 N. A comparer avec la *figure suivante*

c) Radiochromatogramme de T_0 dans le solvant pentanol tertiaire saturé d'ammoniaque 2 N

bation. La confrontation des radiochromatogrammes établis en iode et en tritium, montre la parfaite coïncidence des pics de radioactivité, c'est-à-dire la pureté des composés analysés.

II. — EXTENSION DE LA MÉTHODE

Nous avons préparé de la tyrosine marquée dans les positions α-β en faisant agir l'acide iodhydrique tritié sur de l'acide acétoxy-4, α-acétamidocinnamique, préparé selon SAÜL et TRIKOJUS [112]. Nous avons purifié et identifié la tyrosine marquée en α-β de la même manière que la tyrosine marquée en 3,5.

De plus, nous avons pu par iodation avec ^{131}I obtenir MIT et DIT doublement marquées.

La méthode est directement applicable à la préparation de la iodo-3, thyronine en utilisant l'acide iodo-3, (méthoxy-4', phénoxy-)4, α-acétamidocinnamique [103].

D'une manière plus générale, l'emploi de l'acide iodhydrique tritié peut constituer une méthode pour le marquage de composés iodés possédant une double liaison éthylénique.

CONCLUSIONS

L'emploi de ces deux méthodes nous a permis de réaliser la synthèse de toutes les iodothyronines et de la thyronine. Nous avons contrôlé la pureté de chacun des corps dont nous avons décrit la préparation. Nous avons vérifié l'accord des activités spécifiques expérimentales avec la théorie, ainsi que la position et la stabilité des atomes de tritium.

Nous avons cependant observé un cas de radiodécomposition. De la thyronine marquée en 3,5, avec une activité spécifique de 54 C/mM et conservée à l'état sec pendant un an environ, s'est décomposée en de nombreux corps, parmi lesquels nous avons identifié la tyrosine et le dérivé acétique de T_0. Cette radiodécomposition est vraisemblablement due à la fois à la haute activité spécifique et à la structure propre des thyronines ; en effet, ni T_2 ni l'œstradiol tritiés n'en ont souffert. La conservation de thyronines tritiées avec une activité supérieure à celle que nous avons obtenue, risque donc de se heurter à un obstacle de ce genre (*fig. 13*).

Deuxième partie

METABOLISME DES THYRONINES MARQUEES PAR LE TRITIUM

INTRODUCTION

Les conditions d'étude de la plupart des problèmes posés par la biochimie thyroïdienne, en particulier la désiodation, peuvent être améliorées grâce aux iodothyronines doublement marquées par ^{3}H et ^{131}I. Les expériences sur la désiodation périphérique des hormones thyroïdiennes ont été effectuées soit « in vitro », soit « in vivo », et il est parfois difficile d'en relier les divers résultats obtenus. Ceci tient à des différences méthodologiques, mais surtout à l'intervention « in vivo » de phénomènes physiologiques multiples. En effet, l'iodure radioactif injecté à dose traceuse à un animal, est impliqué dans toute une série de réactions concomitantes (biosynthèse, dégradations, détoxications, excrétions) soumises à des régulations physiologiques multiples. La complexité et la simultanéité de processus métaboliques divers empêchent même d'établir un bilan global exact de la désiodation. Cependant leur résultat est la libération et l'excrétion d'iodure minéral [56].

On a également étudié la désiodation après injection, à des rats thyroïdectomisés, d'une iodothyronine marquée par ^{131}I [99, 105]. On élimine ainsi la biosynthèse et ses implications : désiodation des iodotyrosines, recyclage de l'iode et présence d'autres corps iodés d'origine thyroïdienne, dont les modalités de désiodation sont différentes. Néanmoins demeurent les problèmes liés au transport de l'iodothyronine, à la production de conjugués par le foie [20, 96, 129] et le rein [20, 29, 96]), et à leur circulation entérohépatique, au mécanisme d'élimination de l'iodure.

Les résultats obtenus « in vivo » dans ces conditions montrent que le principal produit radioactif de la désiodation est l'iodure, quels que soient les iodothyronines et les tissus étudiés (si l'on excepte la thyroïde qui ne désiode pas les iodothyronines) [95]. Dans certains cas, on a pu mettre en évidence de petites quantités d'une thyronine partiellement désiodée. Ainsi, dans des extraits rénaux, la T'_2 a pu être caractérisée après injection de T_3 [100] et de T'_3 [104], la désiodation ayant suivi un processus apparemment non spécifique. Le faible pourcentage de T'_2 trouvée par rapport à la quantité d'hormone

injectée diminue la signification de sa présence ; en effet, on ne sait s'il s'agit d'une production ou d'une concentration rénales. Cette dernière possibilité est cependant en désaccord avec l'élimination globale rapide de T'_2 [98]. Divers auteurs ont signalé d'autre part la transformation de T_4 en T_3 [42, 54, 58]. Une controverse existe encore actuellement à ce sujet, mais cette possibilité n'est plus soutenue que par un seul groupe d'expérimentateurs. Ces résultats de désiodation partielle sont à comparer avec les caractères de stabilité des deux paires d'atomes d'iode, établis par des études de désiodation chimique. En présence de nickel de Raney, les atomes en 3,5 sont libérés les premiers, puis ceux en 3',5' [109].

Pour isoler le problème de la désiodation, de nombreux auteurs ont réalisé des expériences « in vitro ». Les iodothyronines marquées par ^{131}I ont été incubées avec des coupes de tissus [75, 143], des homogénats [127, 143], des fractions cellulaires [4, 117], des extraits salins [77, 88]. Une fois encore, l'iodure est le seul métabolite de désiodation incontestable.

La formation de T_3 après incubation de T_4 a été rapportée [3, 22, 60, 61], mais ces résultats suscitent les mêmes réserves que ceux des expériences « in vivo ». De nombreux auteurs ont indiqué que l'activité désiodante des coupes et des homogénats de foie et de rein de rat est thermostable [26, 77, 143]; d'autres ont trouvé une activité dans des extraits alcooliques d'homogénats [72]. Ces résultats ont incité à croire au caractère non enzymatique de la désiodation. Des études ultérieures ont montré par contre que le système désiodant des fractions cellulaires est thermolabile et de nature protéique [73]. La différence de comportement entre les systèmes totaux et les fractions isolées a été expliquée par le rôle protecteur sur les iodothyronines, de protéines cellulaires du type « TBP » vis-à-vis de la désiodation [65, 123]. Par ailleurs, l'inhibition de la désiodation par le chlorure mercurique [127, 143], le butyl-hydroxy-diiodobenzoate [116], les cyanures et l'anaérobiose [116] et son activation par Fe^{2+} et les flavines [122] ont montré que la réaction était biocatalytique. Les descriptions de préparations purifiées solubles en ont apporté la confirmation [65, 121]. La purification de la thyroxine-désiodase, d'après Lissitzky, Benevent et Roques [67], a été réalisée de la manière suivante. Du muscle squelettique de lapin est homogénéisé et centrifugé ; le surnageant présente une activité spécifique 1,7 fois plus grande que l'homogénat. Après dialyse, une précipitation par le sulfate d'ammonium (45-56 %) élève l'activité à 41,3. Enfin un passage sur une colonne de diéthyl-amino-éthylcellulose fournit une préparation 80 fois plus active que l'homogénat initial.

Les différents systèmes décrits ne présentent pas les mêmes propriétés à l'égard des inhibiteurs, des activateurs et de la chaleur : ces divergences sont peut-être dues à l'existence de plusieurs mécanismes de désiodation enzymatiques ou chimiques.

Au cours de l'année 1961, des résultats nouveaux ont été publiés par Lissitzky et coll. [68, 69, 74], Plaskett [89], Ingbar et Galton [34], Tata [124, 125], Yamamoto et coll. [118, 140, 141, 142] : nous les discuterons en détail plus loin et les comparerons aux nôtres.

- I -

ETUDE QUALITATIVE COMPAREE DE LA DESIODATION DES IODOTHYRONINES MARQUEES PAR LE TRITIUM ET L'IODE RADIOACTIF

Les principaux résultats des études sur la désiodation « in vitro » de T_4 et T_3 marquées par ^{131}I peuvent être ainsi résumés : on n'a jamais pu mettre en évidence des produits de désiodation partielle. L'étude chromatographique des milieux d'incubation met en évidence de l'iodure, en dehors d'un reste d'hormone incubée. De nombreux auteurs signalent également la présence à l'origine des chromatogrammes, de quantités variables de matériel radioactif, que la plupart d'entre eux se sont longtemps accordés à considérer comme un artéfact. Enfin, et en relation avec la nature du substrat utilisé, la présence éventuelle des dérivés acétiques de l'hormone étudiée a été signalée.

La grande diversité dans les conditions expérimentales mises en œuvre par les différents auteurs, nous a incité à reprendre l'étude de cette réaction en la faisant porter parallèlement sur des produits marqués par l'iode radioactif et par le tritium ou sur des produits doublement marqués.

Les variantes expérimentales ont porté :

— sur la nature de la méthode analytique employée ;

— sur la nature du substrat étudié :

— sur les conditions expérimentales dans lesquelles sont poursuivies les incubations.

I. — ÉTUDE DE LA DÉSIODATION DE T_3 ET DE T_4 PAR INCUBATION AVEC DES COUPES D'ORGANES ET DES HOMOGÉNATS

• Mode opératoire

Incubation de coupes d'organes :

Des coupes d'une épaisseur inférieure à 0,5 mm sont préparées à partir du foie, du rein et du muscle de rat prélevés rapidement sur des animaux tués par décapitation et saignés. On les met en suspension dans des solutions de Krebs-Ringer phosphaté ou carbonaté (150 mg de poids frais par ml) en présence de quantités variables d'hormones (10^{-5} à 10^{-7} M). L'incubation est poursuivie dans un bain-marie thermostaté avec agitation, sous atmosphère d'air ou de carbogène, pendant des temps variant de une à deux heures. Quelques essais sont effectués avec des coupes chauffées pendant trois minutes à 100° (coupes bouillies).

Incubation d'homogénats :

Les animaux sont décapités et saignés, leurs organes sont rapidement prélevés. On fait un homogénat grossier à l'aide d'un broyeur à couteaux, puis un plus fin avec un homogénéiseur du type Potter-Evejhem « all glass ». Nous avons préparé des homogénats au dixième dans des solutions de Krebs-Ringer, auxquels nous avons ajouté des quantités variables d'hormones (10^{-5} à 10^{-7} M). De même que pour les coupes, nous avons utilisé des homogénats bouillis.

Nous avons réalisé plusieurs essais dont les données expérimentales sont résumées dans le *Tableau IX*.

1) *Extraction des milieux d'incubation*

Les incubats après acidification à pH = 1 par l'acide chlorhydrique sont extraits à trois reprises par un égal volume de n-butanol. Les phases butanoliques sont réunies et concentrées sous pression réduite, puis analysées par chromatographie sur papier. Les solvants utilisés sont ceux décrits dans la première partie de ce travail.

• Résultats

Dans la plupart des cas, l'analyse chromatographique de l'extrait butanolique ne permet l'identification que de l'iodothyronine et de l'iodure par comptage de ^{131}I et de l'iodothyronine par comptage de ^{3}H (*fig. 14 a-b*).

TABLEAU IX

^{3}H - T_4	$_{3}H$ - T_3	*Coupes*	*Homogénat*	*KR phos.*	*KR carb.*	*Durée d'incubation à 37°*
$1,4 . 10^{-5}$	—	Foie	—	pH = 6,75	—	1 h
$1,4 . 10^{-5}$	—	Rein	—	6,75	—	1 h
$5 . 10^{-6}$	—	Rein	—	6,8	—	1 h 30
10^{-6}	—	—	Foie	—	pH = 7,3	2 h
10^{-6}	—	—	Foie bouilli	—	7,3	2 h
10^{-6}	—	—	Muscle	—	7,3	2 h
10^{-6}	—	—	Muscle bouilli	—	7,3	2 h
10^{-6}	—	—	Rein	—	7,3	2 h
10^{-6}	—	—	Rein bouilli	—	7,3	2 h
—	10^{-6}	—	Foie	—	7,3	2 h
—	10^{-6}	—	Foie bouilli	—	7,3	2 h
	$7 . 10^{-7}$	Foie	—	6,8	—	1 h
	$7 . 10^{-7}$	Rein	—	6,8	—	1 h

^{131}I ^{3}H - T_4	^{131}I ^{3}H - T_3	*Coupes*	*Homogénat*	*KR phos.*	*KR carb.*	*Durée d'incubation à 37°*
10^{-6}	—	Foie	—	—	6,8	2 h
—	10^{-6}	Foie	—	—	6,8	2 h

Cependant, dans certains cas, la composition de l'extrait butanolique est plus complexe : on peut, en effet, y déceler outre l'hormone et l'iodure, les dérivés acétiques de la première, des corps inconnus et de la thyronine (*fig. 15*).

Le taux de cette dernière ne dépasse cependant jamais 10 % de la radioactivité totale extraite. Ainsi, même lorsqu'elle est présente, T_0 ne correspond jamais à la quantité d'iodure libérée dans le milieu. La conclusion de cette observation est la suivante : la partie organique de la molécule de thyronine prenant naissance par désiodation, n'est pas extractible par le n-butanol. Les tissus bouillis ne désiodent pas ; l'emploi de Krebs-Ringer phosphaté ou carbonaté, et les variations de pH consécutives, ne modifient pas sensiblement la désiodation.

Quoi qu'il en soit, le fait que l'extraction n'est pas quantitative interdit de faire une étude comparée de la désiodation par cette méthode. En effet, fait saillant et très significatif, les produits tritiés provenant de la dégradation des hormones thyroïdiennes ne sont manifestement pas extractibles par le n-butanol acide. On pouvait dès lors penser que le tritium, occupant les positions α et β de la chaîne alanine des iodothyronines, était soit libéré dans le milieu sous forme d'eau, soit inclus dans une combinaison insoluble dans le n-butanol acide. Dans le premier cas, l'eau tritiée formée est partiellement dissoute dans le butanol et éliminée au cours de la concentration par distillation des extraits butanoliques ou par les solvants chromatographiques. Dans le second cas, les résultats indiquaient qu'il ne pouvait s'agir de T_0 aisément extraite par le n-butanol acide ; le matériel tritié insoluble pouvait dès lors être lié à du matériel protéique, la liaison étant plus stable que celles intervenant dans les combinaisons de T_4 avec les différentes TBP sériques [14, 123] ou cellulaires [120, 123], directement rompues par un tel traitement. Ces divers résultats et les réflexions qu'ils suscitent nous ont incité à établir un bilan de la désiodation.

2) *Bilans de désiodation*

Pour obtenir des valeurs réelles de désiodation, nous avons utilisé une technique mise au point et décrite par Lissitzky et ses collaborateurs [133] : une partie aliquote des milieux d'incubation, 0,5 ml par exemple, est additionnée de 0,4 ml de sérum et de 0,1 ml d'une solution d'iodure de potassium à 40 g/l. Ce mélange est précipité par un égal volume d'une solution d'acide trichloracétique à 20 %. On mesure la radioactivité avec un compteur à scintillation (cristal creux de NaCl activé au Tl.) et l'on sépare le précipité par centrifugation. Après deux lavages, la radioactivité de ce dernier est déter-

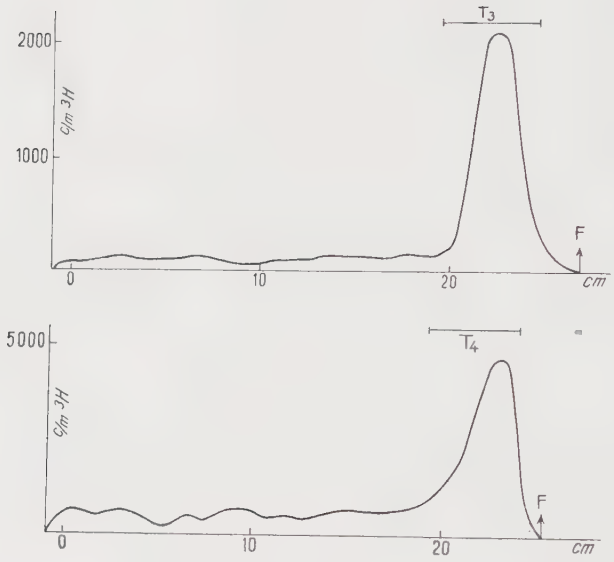


FIGURE 14

a) Radiochromatogramme d'un extrait butanolique d'un milieu d'incubation de ^{3}H-T_3 ($5 . 10^{-7}$ M) avec un homogénat de foie

b) Radiochromatogramme d'un extrait butanolique d'un milieu d'incubation de ^{3}H-T_4 ($5 . 10^{-6}$ M) avec des coupes de rein

Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

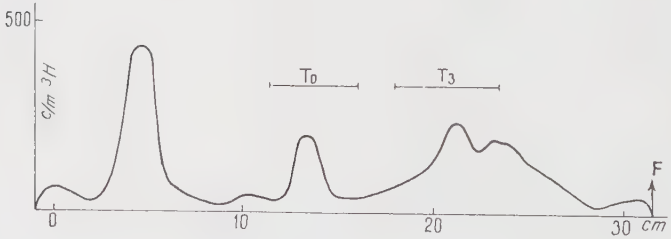


FIGURE 15

Radiochromatogramme de l'extrait butanolique d'un milieu d'incubation de T_3 tritiée ($1,4 . 10^{-5}$ M) avec des coupes de rein de rat pendant une heure à 37°. Solvant : n-butanol saturé d'ammoniaque 2 N

minée. La différence entre la radioactivité totale et celle du précipité donne la quantité d'iodure présente. En effet, après introduction dans le milieu d'un excès de sérum, la totalité de la thyroxine en solution se trouve liée à de la TBP et précipite avec elle ; les auteurs ont vérifié que toute la radioactivité soluble était constituée par de l'iodure.

Le *Tableau X* rend compte de la désiodation de la thyroxine par des coupes et des homogénats. Il montre que dans le cas de coupes, on néglige la radioactivité qu'elles ont fixée ; de ce fait, les taux de désiodation se trouvent arbitrairement augmentés.

Nous avons voulu établir un bilan plus précis, tenant compte de la répartition des substances marquées par ^{131}I entre les coupes et leur milieu d'incubation. Nous avons fait incuber à 37° pendant une heure des coupes de foie de rat (150 mg par ml de tampon Krebs-Ringer carbonaté) en présence de quantités croissantes de ^{131}I-T_4 ($6 \cdot 10^{-9}$ M ; $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ M et $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ M).

Le *Tableau XI, a* rend compte du pourcentage d'iodure présent dans le liquide surnageant (valeurs établies par comptage d'une partie aliquote). Dans le but de connaître la quantité et la nature de la radioactivité incluse dans les coupes, celles-ci sont retirées du milieu d'incubation, séchées sur papier filtre, broyées dans le mélange suivant : 0,1 ml de la solution de KI à 40 g/l, 0,4 ml de sérum et 1 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 20 % et comptées avec un compteur à scintillation. Après centrifugation, le culot est lavé deux fois par 1,5 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 10 % et 0,1 ml de la solution de KI. On reprend le précipité par 1,8 ml de solution d'acide trichloracétique à 10 % et on le compte après mise en suspension. L'examen du *Tableau XI, b* montre que les coupes renferment un pourcentage non négligeable d'iodure : il est donc nécessaire d'établir un bilan global de la désiodation en rapportant la somme de l'iodure, présent dans le milieu et dans les coupes, à la radioactivité totale mise en œuvre (*Tableau XI, c*).

Lorsque la concentration initiale de l'hormone croît, le pourcentage de désiodation décroît, cependant la quantité absolue d'hormone désiodée augmente.

3) *Analyse chromatographique directe des milieux totaux d'incubation*

Une partie aliquote des liquides surnageants des coupes ou des homogénats est prélevée à la fin de l'incubation et déposée sans extraction sur des chromatogrammes. Pour disposer d'une radioactivité en tritium suffisante, sans augmenter la concentration en hormone

	T_4	Coupes	Homogénat 1/10e	FMN $5 \cdot 10^{-5}$ M	KRP	I− %	I− % corrigé	
1	10^{-5}	150 mg			1,5 ml	60	44	47,4
2	10^{-5}	150 mg			1,5 ml	66,8	50,8	
3	10^{-7}	150 mg			1,5 ml	66,7	58,1	56,7
4	10^{-7}	150 mg			1,5 ml	64	55,4	
5	10^{-5}		1 ml	0,5 ml		38,5	16,2	15,7
6	10^{-5}		1 ml	0,5 ml		37,6	15,3	
7	10^{-7}		1 ml	0,5 ml		38,8	15,7	15,2
8	10^{-7}		1 ml	0,5 ml		37,8	14,7	
9	10^{-5}				1,5 ml	18,5		
10	10^{-7}				1,5 ml	21,1		
11	10^{-5}			0,5 ml	1 ml	34,4		
12	10^{-7}			0,5 ml	1 ml	36,3		

TABLEAU X

Désiodation de ^{131}I-T_4 par des coupes de foie de rat

Durée de l'incubation : 1 heure à 37°

TABLEAU XI

Désiodation de ^{131}I-T_4 par des coupes et homogénats de foie de rat

Durée de l'incubation : 1 heure à 37°

a : Pourcentage d'iodure dans le surnageant

b : Pourcentage d'iodure dans les coupes

c : Pourcentage « vrai » de la désiodation

	T_4	a			b			c		
		I− %	I− % corrigé		I− %	I− % corrigé		I− %	I− % corrigé	
1	10^{-7} M	57,4	54,1	55,8	13,7	10,4	12,2	33,4	30,1	37,2
2	10^{-7}	60,8	57,5		17,3	14		47,6	44,3	
3	10^{-4}	12,8	9,5	10,4	5,0	1,7	1,8	9,5	6,2	7,0
4	10^{-4}	14,6	11,3		5,3	2,0		11,1	7,8	
5	10^{-3}	11,2	7,9	7,5	3,7	0,4	1,1	7,9	4,6	4,7
6	10^{-3}	10,5	7,2		5,2	1,9		8,2	4,9	

au delà de 10^{-5} M, nous avons analysé des volumes de 50 µl. Nous avons vérifié par l'incorporation de témoins non radioactifs en quantité révélable, que leur migration n'est pas affectée par les protéines et les sels du milieu.

- Incubations poursuivies a 37°

L'incubation de T_4 et de T_3 avec des coupes et des homogénats de différents tissus (*Tableau XII*) fournit des résultats variables quantitativement et qualitativement d'une expérience à l'autre. Parmi les causes de ces variations, les plus probables nous semblent être des différences individuelles ou saisonnières dans l'état physiologique de l'animal. Malgré la disparité des résultats, nous sommes parvenus à tirer quelques conclusions quant à la nature des métabolites les plus fréquents.

TABLEAU XII

^{3}H - T_4	^{3}H - T_3	*Coupes*	*Homogénat*	*KR carbonaté*	*Temps d'incubation à 37°*
10^{-5}		Foie		pH = 6,4	2 h
10^{-5}		Muscle		6,4	2 h
10^{-5}		Muscle		6,4	6 h
10^{-5}			Muscle	6,4	4 h
	10^{-5}	Foie		6,4	2 h

^{131}I - T_4	^{131}I - T_3	*Coupes*	*Homogénat*	*KR carbonaté*	*Temps d'incubation à 37°*
10^{-5}		Foie		pH = 6,5	2 h
	10^{-5}	Foie		6,5	2 h

^{3}H - ^{131}I T_4	^{3}H - ^{131}I T_3	*Coupes*	*Homogénat*	*KR carbonaté*	*Temps d'incubation à 37°*
10^{-5}		Foie		pH = 6,5	2 h
10^{-5}			Foie	6,5	3 h
	$5 \cdot 10^{-6}$	Foie		6,5	2 h
	10^{-5}	Foie		6,5	2 h

Les produits principaux, c'est-à-dire ceux qui proviennent de la désiodation, sont sensiblement les mêmes avec T_4 et T_3 : il s'agit d'iodure et de matériel de Rf = 0, ce dernier étant marqué à la fois par ^{131}I et par ^{3}H (*fig. 16*).

Dans certains cas, nous avons pu en utilisant des iodothyronines tritiées ou doublement marquées, mettre en évidence de petites quantités de thyronine T_0, mais jamais assez pour correspondre à l'iodure libéré dans le milieu. Dans le cas de T_4, et pour des désiodations assez importantes, nous avons pu identifier de la tyrosine tritiée en quantité non négligeable (*fig. 17*). Enfin, principalement avec T_3, incubée en présence de foie ou de rein, nous avons pu montrer la formation massive du dérivé acétique (*fig. 18 a*). Nous avons confirmé la nature de ce dernier par élution de la bande de Rf correspondant analysée dans un autre solvant (*fig. 18 b*).

- Incubations poursuivies a 37° puis a 0°, ou a 0° directement

Pour augmenter le taux de désiodation, qui dépassait rarement 20 % après une incubation de deux heures à 37°, nous avons étudié, en nous inspirant des travaux d'Etling et Barker [25], la désiodation à froid.

Nous avons procédé de deux façons : les tissus préparés, ainsi que nous l'avons décrit précédemment, sont incubés à 0° avec T_4 ou T_3 à la concentration de 10^{-5} M, directement ou après deux heures d'incubation à 37°. De cette manière, nous avons obtenu des taux de désiodation importants après vingt-quatre heures d'incubation à 0°, ce qui nous a permis d'identifier les produits tritiés correspondants.

Nous n'avons pas trouvé de différences qualitatives importantes par rapport aux résultats déjà acquis grâce aux expériences à 37° : de l'iodure, du matériel de départ marqué à la fois par ^{3}H et ^{131}I, des quantités parfois importantes de tyrosine tritiée et pratiquement jamais de T_0 (*fig. 19* et *20*).

Tous ces résultats, d'une extrême variabilité, due sans doute à la concurrence entre les différentes réactions, concurrence que traduit la formation en quantités variables d'iodure, de matériel de Rf = 0, de dérivés acétiques, de tyrosine et même de thyronine. Pour obtenir des résultats plus facilement interprétables, nous avons fait appel à des systèmes plus simples, fractions cellulaires et préparations enzymatiques purifiées.

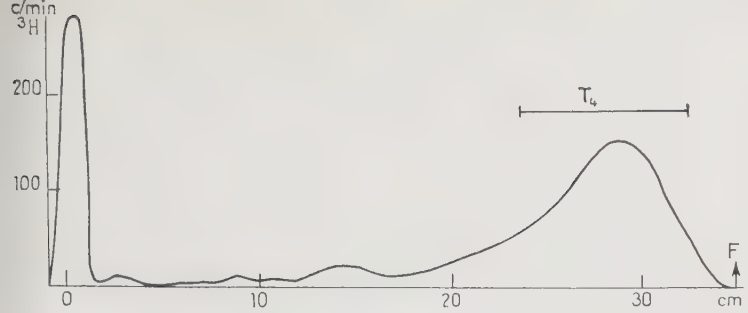
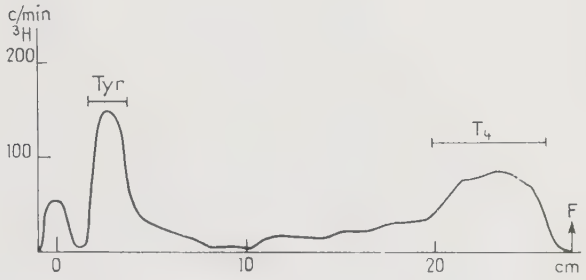


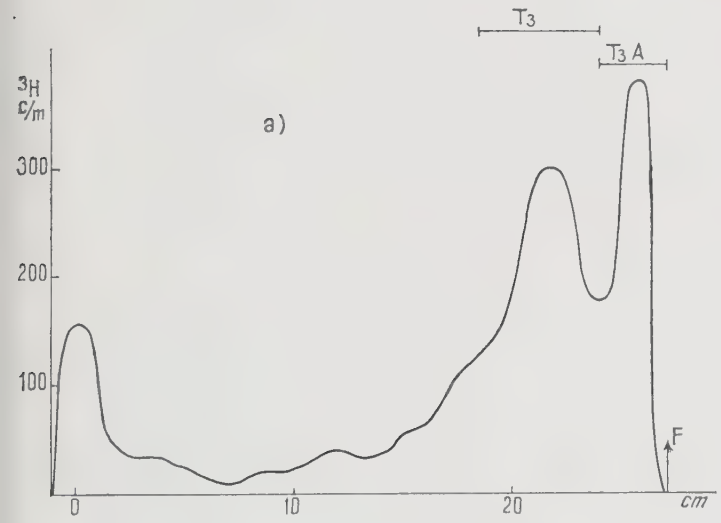
FIGURE 16

Radiochromatogramme d'un milieu d'incubation de ^{3}H-T_4 avec un homogénat de muscle de rat pendant deux heures. Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

FIGURE 17

Radiochromatogramme d'un milieu d'incubation de ^{3}H-T_4 avec des coupes de muscle de rat pendant deux heures. Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)





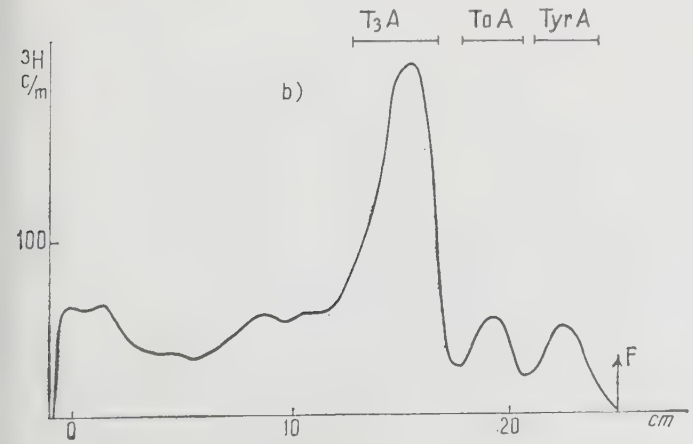


FIGURE 18

Incubation de ^{3}H-T_3 avec des coupes de foie de rat pendant deux heures à 37°

a) Radiochromatogramme du surnageant total. Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

b) Radiochromatogramme d'un éluat du chromatogramme précédent de la zone de T_3A dans le solvant méthanol - acétate d'ammonium 0,2 M (1, 2,5)

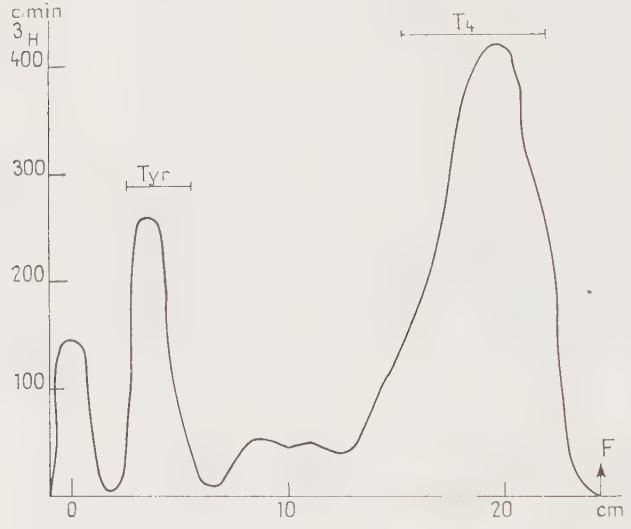


FIGURE 19

Radiochromatogramme d'un milieu d'incubation de ^{3}H-T_4 avec des coupes de foie de rat pendant deux heures à 37° et trois jours à 0°. Solvant : butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

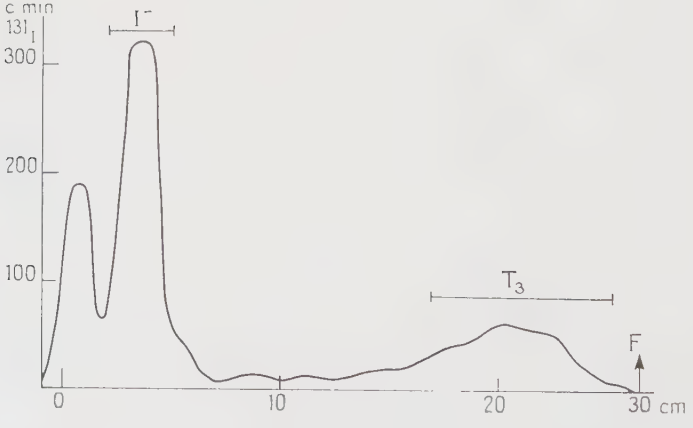


FIGURE 20

Radiochromatogramme d'un milieu d'incubation de ^{131}I-T_4 avec des coupes de foie de rat pendant deux heures à 37° et trois jours à 0°. Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

II. — ÉTUDE DE LA DÉSIODATION DE T_4 PAR INCUBATION EN PRÉSENCE DE FRACTIONS CELLULAIRES

Pour obtenir un matériel enrichi en désiodase et surtout pour le séparer des TBP sériques et cellulaires qui protègent les hormones thyroïdiennes de la désiodation, nous nous sommes préoccupés de préciser la répartition de l'enzyme entre les divers constituants de la cellule. C'est pourquoi nous avons procédé à un fractionnement grossier des homogénats. Un homogénat de foie au dixième dans le saccharose 0,25 M est préparé ainsi que nous l'avons décrit plus haut.

Le fractionnement est obtenu par centrifugation différentielle [1] dans les conditions décrites par SCHNEIDER [113].

Une fraction lourde renfermant essentiellement les noyaux et les stromas, est isolée par une centrifugation à 700 g pendant deux minutes et éliminée. La fraction surnageante de cette première centrifugation est testée quant à son activités désiodante sous le nom d' « homogénat ». L'homogénat ainsi obtenu est divisé en deux sous-fractions par une centrifugation à 5.000 g pendant dix minutes. Le culot est repris dans un volume de solution de Krebs-Ringer tel que la concentration soit la même que dans l'homogénat initial : cette fraction est constituée principalement par des mitochondries. Le surnageant est ramené au volume initial avec de la solution de Krebs-Ringer.

L'activité désiodante des trois fractions : « homogénat », « mitochondries » et « surnageant », est mesurée sur de la thyroxine tritiée et sur de la thyroxine marquée à la fois par ^{131}I et par ^{3}H, en présence de FMN à la concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Les données expérimentales et les taux respectifs de désiodation obtenus sont rapportés dans le *Tableau XIII*.

La localisation de l'enzyme dans la fraction mitochondriale est en accord avec les résultats de nombreux auteurs : YAMAZAKY et SLINGERLAND [143], LISSITZKY et coll. [65, 74], YAMAMOTO et coll. [141], mais pas avec ceux de TATA [121], qui situe la désiodase dans les microsomes et le surnageant.

L'observation des radiochromatogrammes obtenus par action de la fraction mitochondriale sur ^{3}H-T_4 et ^{131}I-^{3}H-T_4 permet de déceler uniquement du matériel de Rf = 0, de l'iodure, de la T_4 et de petites quantités de T_4A (*fig. 21*), la présence de FMN favorisant la désiodation aux dépens de la formation des acétiques [140, 142].

---

(1) Spinco « preparative » Rotor n° 40.

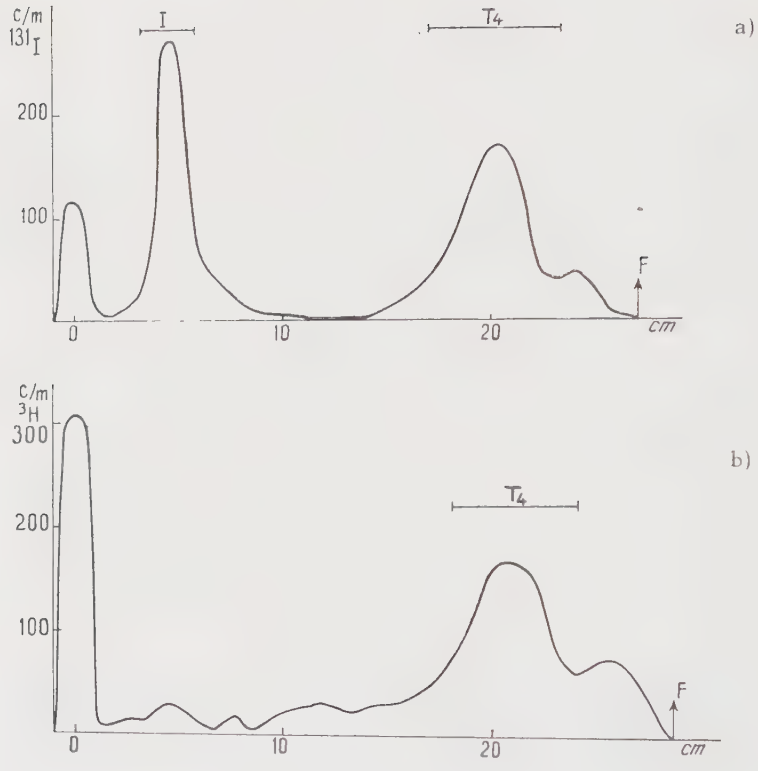


FIGURE 21

Radiochromatogrammes de milieux d'incubation de thyroxine avec une suspension mitochondriale correspondant à 150 mg de foie frais

a) ^{131}I-T_4 (10^{-5} M)

b) ^{3}H-T_4 (10^{-5} M)

Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

TABLEAU XIII

	Homogénat + FMN	*Mitochondries + FMN*	*Surnageant + FMN*
Composé de			
Rf = 0	9,7 %	11,9 %	6,6 %
Iodure	29,5 %	32,5 %	5 %
Thyroxine	60,8 %	55,6 %	88,4 %

Les quantités d'homogénat, de suspension mitochondriale et de surnageant, correspondent à 150 mg de tissus frais. A titre de comparaison, nous donnons ci-dessous les valeurs de désiodation obtenues avec 150 mg de coupes de foie pendant la même expérience.

Coupes :

— Corps de Rf = 0 = 12 %
— Iodure = 38,9 %
— Thyroxine = 49,1 %

III. — ÉTUDE DE LA DÉSIODATION DE T_3 ET T_4 TRITIÉES PAR INCUBATION AVEC UNE PRÉPARATION PURIFIÉE DE THYROXINE-DÉSIODASE

Pour écarter la formation éventuelle des dérivés acétiques, nous avons utilisé une préparation purifiée de thyroxine-désiodase [1]. L'enzyme est solubilisée extemporanément dans une solution de Krebs-Ringer pH = 6,4, à raison de 2 mg par ml.

Les essais contiennent : 0,4 ml de la solution d'enzyme (2 mg/ml); 0,5 ml d'une solution 10^{-4} M de FMN dans le Krebs-Ringer pH = 6,4 ; 0,1 ml d'une solution d'iodothyronine (10^{-5} M) dans le propylène glycol à 50 %. Les seuls produits de l'incubation de T_4 et de T_3 dans ces conditions, sont l'iodure et du matériel de Rf = 0 (radiochromatogrammes des *fig. 22* et *23*).

La somme des pourcentages de ^{131}I de l'iodure et du corps de Rf = 0 est égale au pourcentage en ^{3}H de ce dernier. En d'autres termes, la quantité de corps de Rf = 0 mesurée en ^{3}H est égale à celle de l'iodothyronine disparue. Cette correspondance démontre qu'il n'y a pas de perte de tritium.

(1) Cette préparation nous a été donnée par Monsieur le Professeur S. Lissitzky que nous remercions vivement.

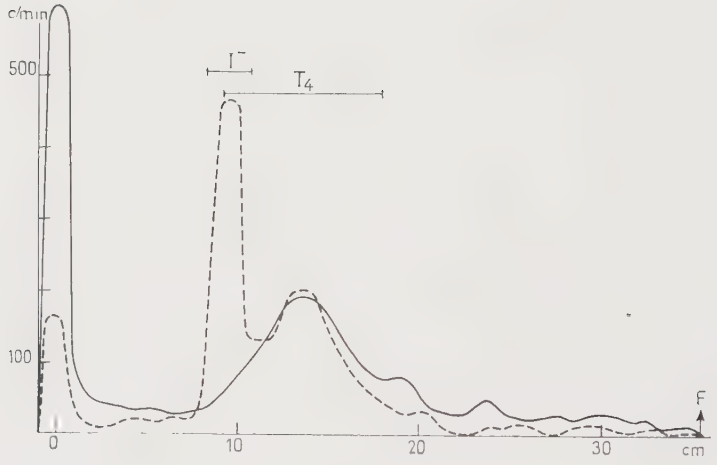


FIGURE 22

Radiochromatogramme * d'un milieu d'incubation de ^{3}H-^{131}I-T_4 avec la thyroxine-désiodase (deux heures à 37°). Solvant : n-butanol saturé d'ammoniaque 2 N

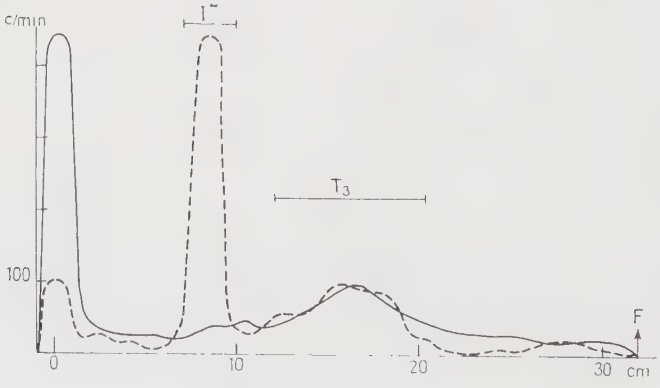


FIGURE 23

Radiochromatogramme * d'un milieu d'incubation de ^{3}H-^{131}I-T_3 avec la thyroxine-désiodase (deux heures à 37°). Solvant : n-butanol saturé d'ammoniaque 2 N

* Comptages de ^{3}H en traits pleins, de ^{131}I en pointillés

DISCUSSION

Dans la première partie de notre travail, nous avons précisé les conditions optima pour l'étude de la désiodation et recherché la nature des métabolites iodés ou tritiés formés. Nos résultats peuvent être résumés comme suit :

Les extraits butanoliques de coupes et d'homogénats renferment toujours de l'iodure et l'hormone étudiée. Parfois, dans le cas de T_3, on trouve en outre des quantités variables de T_0 et de corps inconnus. Une grande partie de la radioactivité due au tritium reste fixée sur les protéines de l'incubat et n'est pas extractible.

Le bilan de la désiodation dans les coupes montre qu'une grande partie de la radioactivité est fixée par celles-ci.

Les métabolites iodés radioactifs identifiés par chromatographie directe du milieu d'incubation des coupes, des fractions cellulaires et de la thyroxine-désiodase sont l'iodure et un corps de Rf = 0. Avec les systèmes non solubles (cellules, mitochondries), on obtient également des quantités variables de dérivés acétiques.

Les métabolites tritiés sont de nature diverse :

On trouve avec les coupes et les homogénats de faibles quantités de T_0 dont le taux ne dépasse jamais 10 %, alors que la désiodation atteint 70 %, et de la tyrosine. Ces deux corps n'apparaissent ni régulièrement, ni en proportion constante et la présence de l'un semble exclure celle de l'autre. Un seul métabolite tritié de Rf = 0 a été retrouvé de manière régulière au cours de plusieurs dizaines d'essais.

Dans le cas des mitochondries, qui renferment la plus grande partie de l'activité désiodante cellulaire et surtout en présence de thyroxine-désiodase, on ne retrouve pas de thyronine. Avec les mitochondries, on identifie quelquefois des dérivés acétiques et de très faibles quantités de tyrosine. Mais, dans tous les cas, le métabolite essentiel est le composé de Rf = 0, dont la teneur en tritium correspond à la plus grande partie de l'hormone disparue. Nous n'avons jamais trouvé de produits de désiodation partielle, tels que T_3, T'_3 ou T'_2.

L'extraction ne permet pas d'obtenir des résultats quantitatifs. La méthode par précipitation à l'acide trichloracétique permet la mesure de la libération de l'iodure, mais ne rend pas compte de la formation d'un produit qui précipite avec le matériel protéique.

La seule méthode qui permette une étude qualitative et quantitative complète du phénomène, est l'analyse chromatographique directe d'une aliquote d'un milieu d'incubation homogène.

L'emploi pour l'étude de la désiodation des hormones thyroïdiennes de systèmes de plus en plus purifiés, nous a permis de définir parmi tous les métabolites obtenus avec des systèmes complexes, ceux dont l'apparition n'est que contingente et ceux dont la formation est directement due à la déshalogénation. Le seul produit de la désiodation de T_4 et de T_3 présentant ce caractère est le composé de Rf = 0, dont la teneur en ^{3}H correspond à la quantité d'iodothyronine disparue et dont la teneur en ^{131}I est celle d'un corps moins iodé que l'iodothyronine initiale. Tous les autres produits sont dus à des réactions compétitives dont l'intensité, variable, semble dépendre des conditions expérimentales.

- II -

ETUDE CINETIQUE DE LA DESIODATION DE T_4 ET DE T_3 MARQUEES PAR ^{131}I ET PAR ^{3}H

Au cours du chapitre précédent, nous avons étudié les conditions de la désiodation et les produits qui en résultent. En utilisant des systèmes de plus en plus purifiés, nous avons pu distinguer entre les métabolites résultant de la déshalogénation par la thyroxine-désiodase et ceux qui étaient le fruit de réactions connexes concurrentes. Pour apporter la preuve que l'iodure et un composé de Rf = 0 marqué simultanément par ^{131}I et ^{3}H étaient les principaux produits de la désiodation, nous avons entrepris une étude cinétique de celle-ci.

Cette étude a été menée parallèlement à l'étude qualitative dont nous venons d'exposer les résultats, en mettant en œuvre les mêmes systèmes biologiques : coupes et homogénats, mitochondries et préparation enzymatique purifiée.

Un métabolite tritié peut être considéré comme un vrai produit de la réaction si un bilan montre qu'il n'y a pas eu perte de ^{3}H.

Dans une seconde partie, nous étudierons les effets de différentes substances sur l'intensité de la désiodation et sur la nature des métabolites.

I. — ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA DÉSIODATION PAR DIFFÉRENTS SYSTÈMES

1) *Coupes et homogénats*

Les rats sont tués par décapitation et saignés, les organes dont on veut étudier la capacité désiodante sont rapidement prélevés et placés dans du liquide physiologique maintenu à 0°.

Des coupes de moins de 0,5 mm d'épaisseur sont faites avec une lame de rasoir et incubées (300 mg par ml) dans une solution de Krebs-Ringer de pH = 6.8. Les homogénats sont préparés dans une solution de Krebs-Ringer carbonaté de pH = 6,8 à la concentration $1/10^{e}$, avec un broyeur à lames, puis un homogénéiseur de Potter-Evejhem. Les autres conditions propres aux différents essais sont résumées dans le *Tableau XIV*.

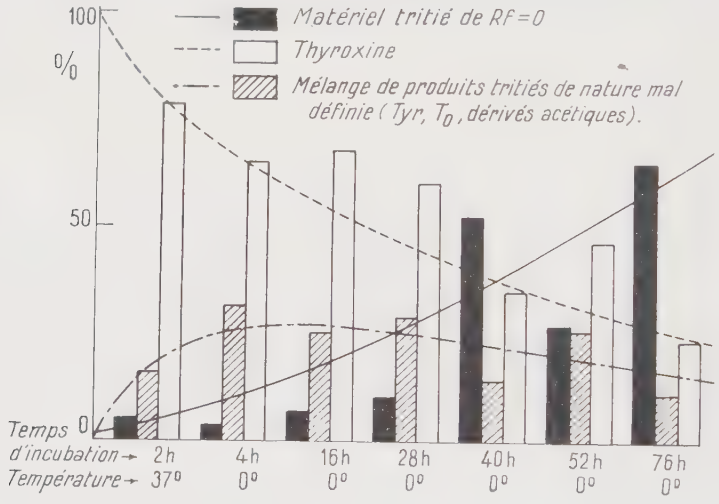


FIGURE 24
Incubation de ^{3}H-T_4 avec des coupes de foie de rat

Les résultats des expériences bien qu'assez confus, car plusieurs réactions se poursuivent concurremment, ont néanmoins permis de faire deux remarques.

La désiodation a lieu à froid (0°) avec ou sans incubation préalable à 37°, la vitesse initiale étant plus faible dans le second cas. L'avantage des incubations poursuivies à froid est d'augmenter considérablement le taux de désiodation sans entraîner des nécroses trop importantes dans les tissus.

De plus, l'étude cinétique de la désiodation permet de montrer l'accumulation de l'iodure et, fait nouveau, celle de matériel marqué par ^{131}I et par ^{3}H au départ de tous les chromatogrammes.

La *figure 24*, qui se rapporte à une incubation de ^{3}H-T_4 (10^{-5} M) avec des coupes de foie de rat, traduit bien ce phénomène ; nous

TABLEAU XIV

^{3}H - T_4	^{3}H - T_3	Coupes	Homogénat	Durée de l'incubation et temps de prélèvement 37°				0°		
10^{-5} M		Foie		2 h	1 j	3 j	14 j			
10^{-5} M		Foie			1 j	3 j	14 j			
10^{-5} M		Foie		2 h	4 h	16 h	28 h	40 h	52 h	76 h
10^{-5} M		Muscle		2 h	4 h	16 h	28 h	40 h	52 h	76 h
10^{-5} M		Muscle			1 h	18 h	42 h	66 h	168 h	216 h
10^{-5} M		Rein		2 h	4 h	16 h	28 h	40 h	52 h	76 h
10^{-5} M			Foie	2 h	4 h	1 j	2 j			
10^{-5} M			Muscle	2 h	4 h	1 j	2 j			
	10^{-5} M	Foie		2 h	1 j	3 j	14 j			
	10^{-5} M	Foie			1 j	3 j	14 j			
	10^{-5} M	Foie		2 h	4 h	16 h	28 h	40 h	52 h	76 h

^{131}I - ^{3}H - T_4	^{131}I - ^{3}H - T_3	Coupes	Homogénat	Durée de l'incubation et temps de prélèvement 37°			0°
10^{-5} M		Foie		2 h	1 j	3 j	14 j
10^{-5} M		Foie			1 j	3 j	14 j
	10^{-5} M	Foie		2 h	1 j	3 j	14 j
	10^{-5} M	Foie			1 j	3 j	14 j

avons évalué pour les différents temps de prélèvement au cours de l'incubation, la répartition de la radioactivité entre trois fractions : la thyroxine, le composé de Rf = 0 et le reste du matériel tritié dont il est difficile de définir la nature (tyrosine, thyronine et dérivés acétiques).

2) *Mitochondries*

Comme nous l'avons vu, le système désiodant est essentiellement mitochondrial ; par ailleurs, nous avons vérifié qu'il n'est pratiquement en compétition qu'avec l'enzyme responsable de la formation des dérivés acétiques. L'addition de FMN à la concentration $5 . 10^{-5}$ M permet de favoriser la désiodation aux dépens de l'oxydation de la chaîne.

• Mode opératoire

Les mitochondries ont été préparées par la méthode de Schneider à partir d'un homogénat au $1/10^{e}$ dans le saccharose 0,25 M centrifugé pendant deux minutes à 700 g. Après une centrifugation à 5.000 g pendant dix minutes, le culot est repris par un volume d'une solution de Krebs-Ringer carbonaté (pH = 6,8) tel que les mitochondries correspondant à 300 mg de tissus frais soient en suspension dans 0,5 ml.

Les essais sont effectués sur un mélange volume à volume de la suspension mitochondriale et d'une solution de FMN à la concentration 10^{-4} M ; l'iodothyronine dont on veut mesurer la désiodation est dissoute dans un petit volume de propylène glycol à 50 %, la concentration finale étant de 10^{-5} M.

Avec une préparation mitochondriale de ce type, nous avons étudié la cinétique de la désiodation de la thyroxine : *a*) marquée à la fois par ^{131}I et ^{3}H ; *b*) uniquement tritiée. D'autres essais ont été poursuivis sur de la thyroxine doublement marquée, mais en utilisant des quantités croissantes de mitochondries.

Des aliquotes des milieux après incubation à 37° pendant quinze, trente, soixante et cent vingt minutes sont analysées par chromatographie dans le solvant butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17).

• Cinétique de la désiodation

Les pourcentages des constituants iodés (corps de Rf = 0 (PX), iodure et thyroxine) sont les mêmes, qu'ils soient calculés sur la somme de la radioactivité enregistrée au niveau des pics ou sur la radioactivité

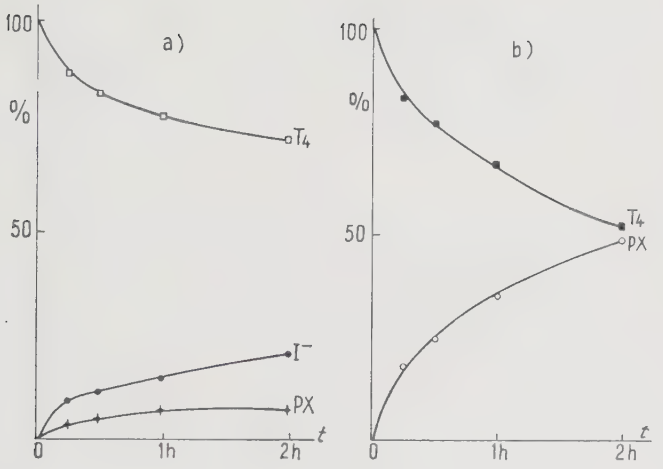


FIGURE 25

Cinétique de désiodation de ^{3}H-^{131}I-T_4 par les mitochondries de 150 mg de foie

a) Comptage de ^{131}I

b) Comptage de ^{3}H

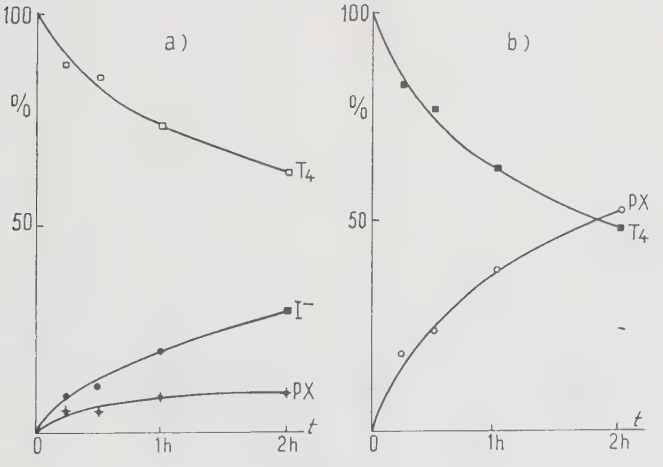


FIGURE 26

Cinétique de désiodation de ^{3}H-^{131}I-T_4 par les mitochondries de 300 mg de foie

a) Comptage de ^{131}I

b) Comptage de ^{3}H

totale présente sur le chromatogramme : cette correspondance signifie qu'il n'existe pas d'autres constituants marqués par ^{131}I dans le milieu. Il n'en est pas de même pour l'établissement des pourcentages des corps tritiés (corps de Rf = 0 et thyroxine) : ceux calculés à partir de la somme des coups comptés au niveau de la thyroxine et du corps de Rf = 0 ne concordent pas avec les pourcentages calculés à partir du tritium total.

La première méthode de calcul montre une désiodation plus importante que la seconde, or ce sont les valeurs calculées sur le total qui correspondent à celles établies au moyen des comptages de ^{131}I.

La discordance entre les pourcentages des deux constituants tritiés suivant la manière de les calculer est due au fait qu'il existe sur les chromatogrammes, entre le départ et la zone de T_4, de petites quantités de corps tritiés non marqués par ^{131}I et mal déterminés, dont la radioactivité totale est assez importante pour fausser les pourcentages des constituants principaux. La présence de ces différents corps et celle de dérivés acétiques visibles sur les radiochromatogrammes représentent environ 30 % de la totalité des coups enregistrés ; ce qui ne permet pas de faire coïncider les pourcentages de thyroxine disparue, calculés en ^{131}I et en ^{3}H (*fig. 25* et *26*). Ces différences peuvent être expliquées en partie par la perte de ^{3}H due à la désamination oxydative d'une fraction de la thyroxine en son dérivé acétique. Cependant, il existe une proportionnalité entre l'intensité de la désiodation et la quantité de mitochondries présente dans le milieu (*fig. 27*).

- Comparaison de la désiodation de T_4, T_3, T_2

Nous avons en outre comparé l'action des mitochondries sur T_4, T_3 et T_2 tritiées : nous avons incubé 0,4 ml d'une suspension mitochondriale correspondant à 300 mg de foie de rat en présence de 0,5 ml d'une solution de FMN (10^{-4} M) et de 0,1 ml d'une solution d'iodothyronine (10^{-5} M). Les diverses solutions ont été faites dans une solution de Krebs-Ringer carbonaté pH = 6,8. Nous avons établi des courbes cinétiques dans les trois cas : celles correspondant à T_2 et à T_3 coïncident, la dégradation de T_4 étant légèrement supérieure. La *figure 28* représente les résultats obtenus après trente minutes d'incubation à 37°.

3) *Préparation enzymatique purifiée*

Pour éliminer toutes les réactions qui étaient en compétition avec la désiodation dans les expériences poursuivies avec les mitochondries,

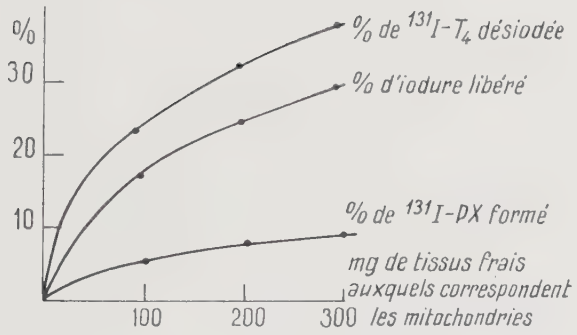


FIGURE 27

Relations entre l'intensité de la désiodation et la quantité de mitochondries

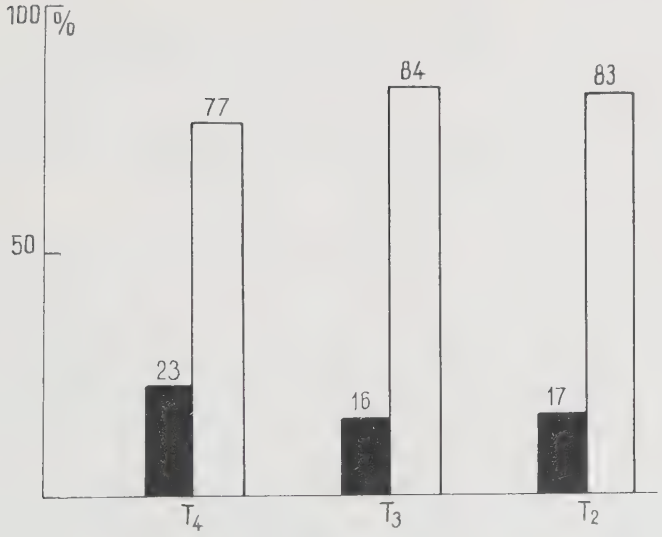


FIGURE 28

Formation de ^{3}H-PX par incubation de ^{3}H-T_4, ^{3}H-T_3, ^{3}H-T_2 (10^{-5} M) avec les mitochondries de 300 mg de foie pendant trente minutes à 37°

nous avons utilisé pour des études cinétiques la préparation enzymatique purifiée qui nous avait déjà servi lors de notre étude qualitative.

• Mode opératoire

Les essais contenaient 0,4 ml d'une solution de thyroxine désiodase à 2 mg/ml de tampon Krebs-Ringer carbonaté pH = 6,8 ; 0,5 ml d'une solution de FMN 10^{-4} M dans le même tampon. L'iodothyronine étudiée est introduite dissoute dans du propylène-glycol à 50 %. Le volume final est ajusté à 1 ml avec du tampon.

• Cinétique de désiodation

Nous avons d'abord établi la cinétique de la désiodation de la thyroxine et de la iodo-3,5,3' thyronine marquées simultanément par ^{131}I et par ^{3}H.

Nous avons préparé dans les deux cas une série de radiochromatogrammes dans le solvant n-butanol, acide acétique, eau (78 : 5 : 17) et nous avons calculé pour chacun des prélèvements la répartition de la radioactivité due à ^{131}I entre le composé de Rf = 0, l'iodure et l'iodothyronine, et de celle due à ^{3}H entre le composé de Rf = 0 et l'iodothyronine.

La parfaite concordance des radiochromatogrammes tracés en ^{131}I et en ^{3}H, et des courbes cinétiques, permet d'affirmer que les seuls produits de la désiodation de T_4 et de T_3 sont de l'iodure minéral libéré dans le milieu et un composé de Rf = 0 contenant la totalité du tritium de l'iodothyronine désiodée et la quantité de ^{131}I complémentaire de celle de l'iodure minéral (*fig. 29* et *30*).

• Cinétique de désiodation comparée des formes D et L de T_4 et T_3

T_4 et T_3 doublement marquées dont nous nous sommes servis au cours de cette étude étaient des formes racémiques D-L. Il nous a donc paru intéressant de comparer la désiodation de la D-L T_4 à celles de la L T_4 et de la D T_4. Nous avons utilisé pour cette comparaison des thyroxines marquées en 3'5' par ^{131}I.

Les courbes cinétiques de désiodation des inverses optiques et du racémique (*fig. 31*) présentent une allure générale semblable et indiquent des taux de désiodation du même ordre.

Pour vérifier que la structure stérique des iodothyronines n'influait pas sur le taux de leur désiodation, nous avons vérifié que la D T_3 se désiodait de la même manière que la D-L T_3 (*fig. 32*). Les diffé-

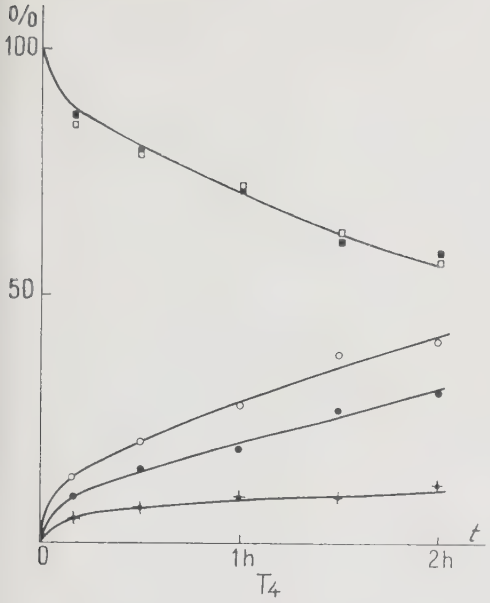


FIGURE 29 : Cinétique de désiodation de ^{3}H-^{131}I-T_4 (D-L) par une préparation purifiée de thyroxine désiodase

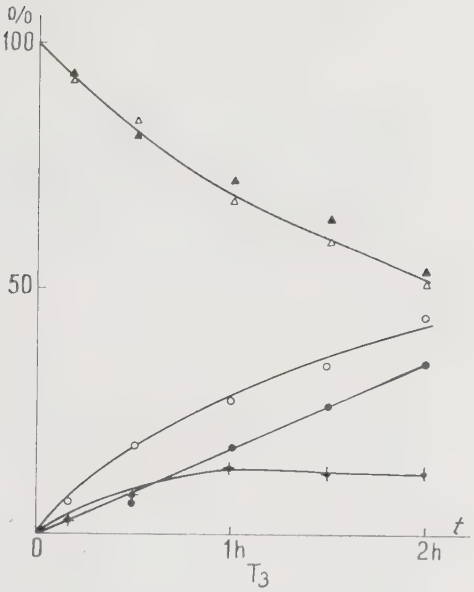
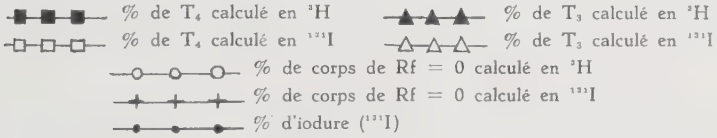


FIGURE 30 : Cinétique de désiodation de ^{3}H-^{131}I-T_3 (D-L) par une préparation purifiée de thyroxine désiodase



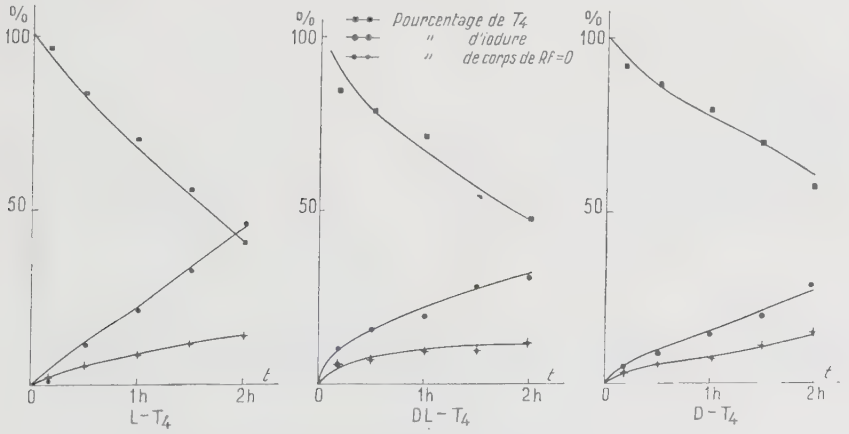


FIGURE 31

Cinétique comparée de désiodation entre L-T_4, D-T_4 et DL-T_4 marquées par ^{131}I

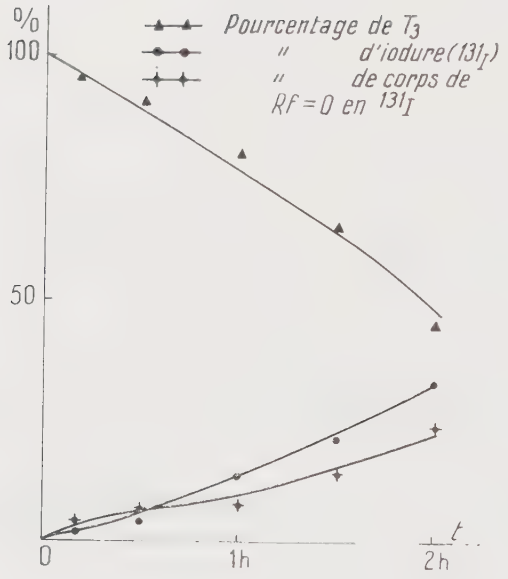


FIGURE 32

Cinétique de désiodation de ^{131}I-D-T_3 par une préparation purifiée de thyroxine-désiodase. (Comparer avec la *fig. 30*)

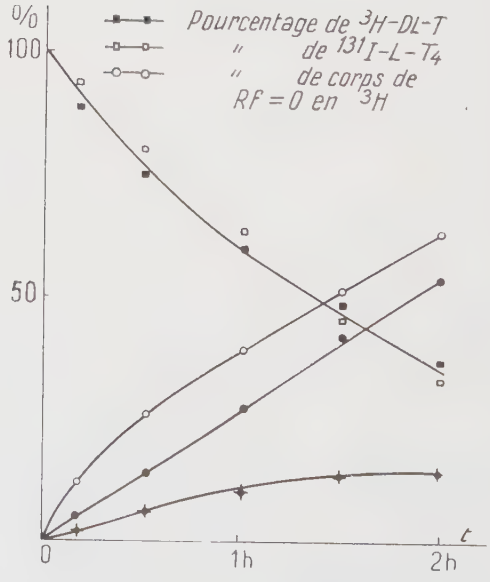


FIGURE 33

Cinétique de désiodation d'un mélange de ^{131}I-L-T_4 et de ^{3}H-DL-T_4 par une préparation purifiée de thyroxine-désiodase

rences que nous avons enregistrées dans les taux de désiodation des formes D et L et du racémique DL, sont trop faibles pour que nous puissions affirmer qu'elles sont significatives, en effet une différence de l'ordre de 10 % n'excède pas les erreurs de comptage, la précision de la chromatographie et les variations entre deux essais parallèles.

Pour réduire au maximum l'erreur systématique, nous avons effectué un autre essai dans lequel nous avons soumis à l'action de la thyroxine-désiodase un mélange de DL-T_4 tritiée à la concentration 10^{-5} M et de L-T_4 marquée par ^{131}I à dose traceuse.

Les comptages de ^{131}I devaient permettre de calculer la désiodation de L-T_4 5 . 10^{-6} M en présence de DL-T_4 10^{-5} M non marquée ; les comptages de ^{3}H, de leur côté, indiqueraient le taux de disparition de DL-T_4 10^{-5} M.

La *figure 33*, qui présente des courbes de disparition superposables pour L-T_4 et DL-T_4 malgré les différences de concentration, permet d'affirmer que la vitesse d'attaque des inverses optiques par la thyroxine-désiodase est la même.

II. — ÉTUDE DE FACTEURS INFLUANT SUR LA DÉSIODATION

L'étude cinétique de la désiodation fournit des indications quantitatives sur la présence à un temps donné dans les milieux d'incubation d'une certaine quantité d'un corps tritié correspondant à la quantité d'iodothyronine disparue et sur la teneur en ^{131}I de ce corps, aussi nous sommes-nous préoccupés de savoir si les effecteurs de la désiodation exercent une action sur la formation du composé de Rf = 0 ou sur sa teneur en iode.

Nous avons réalisé ces divers essais sur une préparation mitochondriale (mitochondries de 300 mg de tissus frais dans un volume de 1 ml) en prenant comme témoin FMN 5 . 10^{-5} M. Tous les essais sont faits sur de la thyroxine doublement marquée 10^{-5} M.

Nous avons étudié l'action de Fe^{2+} et EDTA, celle de divers réducteurs et celle des thyronines.

1) *Action du Fe^{2+} en l'absence ou la présence de FMN et de EDTA*

Tata [122] a signalé l'action activatrice exercée par Fe^{2+} sur la désiodation des hormones thyroïdiennes à la concentration 4 . 10^{-6} M

en présence ou non de FMN et d'EDTA 10^{-3} M. Nous avons mesuré, dans ces conditions, la fixation du tritium au sein du composé de Rf = 0 (*fig. 34*).

2) *Action des réducteurs*

La désiodation « in vitro » des hormones thyroïdiennes exige de l'oxygène [74, 116], aussi est-elle inhibée par les réducteurs.

Nous avons étudié l'action de trois d'entre eux : le propylthiouracile PTU à la concentration de 10^{-3} M, la cystéine 10^{-3} M et le bisulfite SO_3H^- 10^{-3} M. Tous inhibent fortement la désiodation (*fig. 35*) et diminuent plus ou moins la quantité de composé de Rf = 0 formée, tout en modifiant assez peu sa teneur en ^{3}H et ^{131}I.

3) *Action des thyronines*

Nous avons étudié l'action sur la désiodation de la thyroxine, de trois thyronines à la concentration 10^{-3} M : la iodo-3,5,3' thyronine (T_3) dont on sait qu'elle est désiodée par la thyroxine-désiodase, la iodo-3,3', 5' thyronine (T'_3) dépourvue d'activité thyromimétique [106] et inhibitrice de la sécrétion de TSH [21], enfin la thyronine (T_0).

A ces fortes concentrations (10^{-3}), les trois thyronines étudiées, surtout T'_3 et T_0, inhibent la désiodation (*fig. 36*). La formation de corps de Rf = 0 diminue sensiblement de la même manière que la désiodation, mais sa teneur en ^{131}I augmente de deux à trois fois par rapport au témoin.

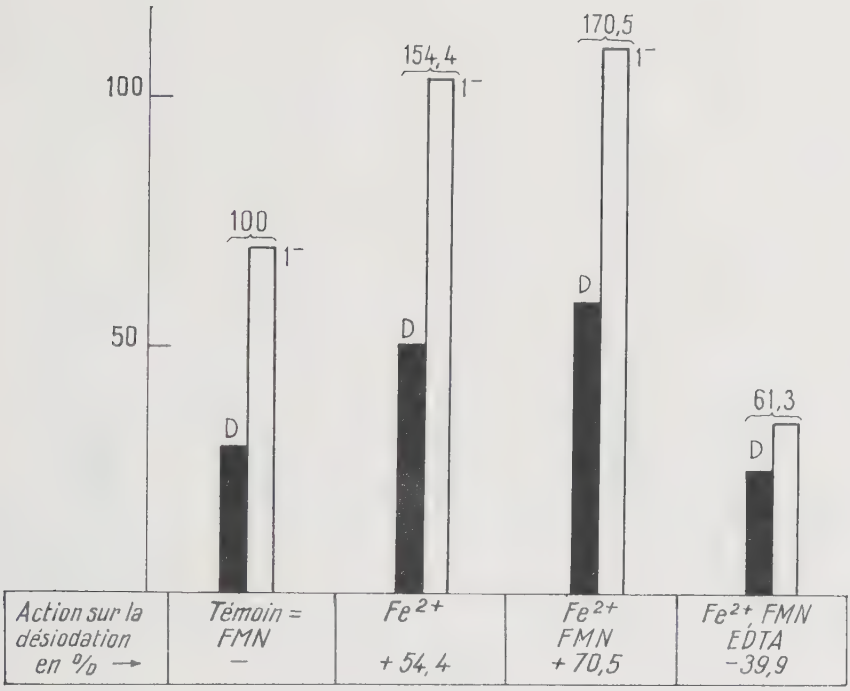


FIGURE 34

Action sur la teneur en ^{131}I et en ^{3}H du composé de Rf = 0

	^{3}H	^{131}I	$^{131}I/^{3}H$
Témoin = FMN	100	100	1
$Fe^{2}+$	166	168	1
$Fe^{2}+$, FMN	61,6	198	3,2
$Fe^{2}+$, FMN, EDTA	17,8	86	4,8

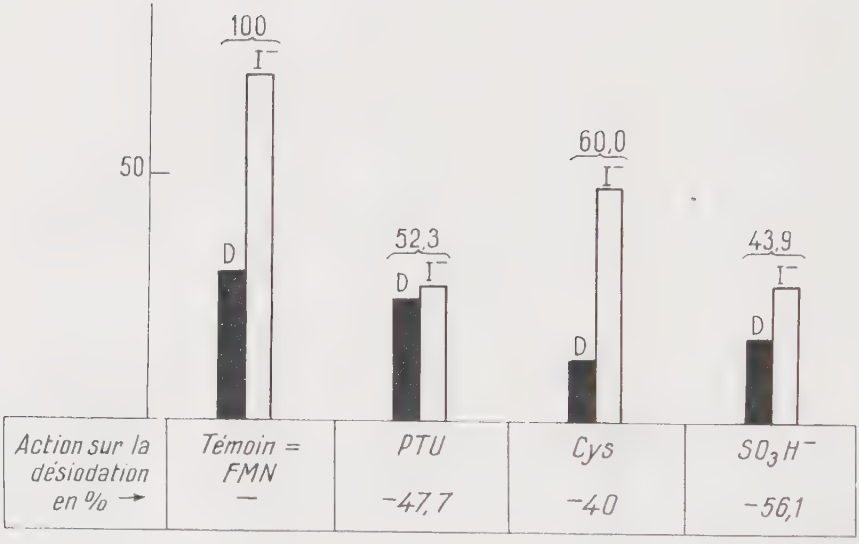


FIGURE 35

Action des réducteurs sur la teneur en ^{131}I et en ^{3}H du composé de Rf = 0

	^{3}H	^{131}I	$^{131}I/^{3}H$
Témoin = FMN	100	100	1
PTU	78,4	82,2	1
Cys	31,9	41,8	1,3
SO_3H^-	63,8	54,3	0,8

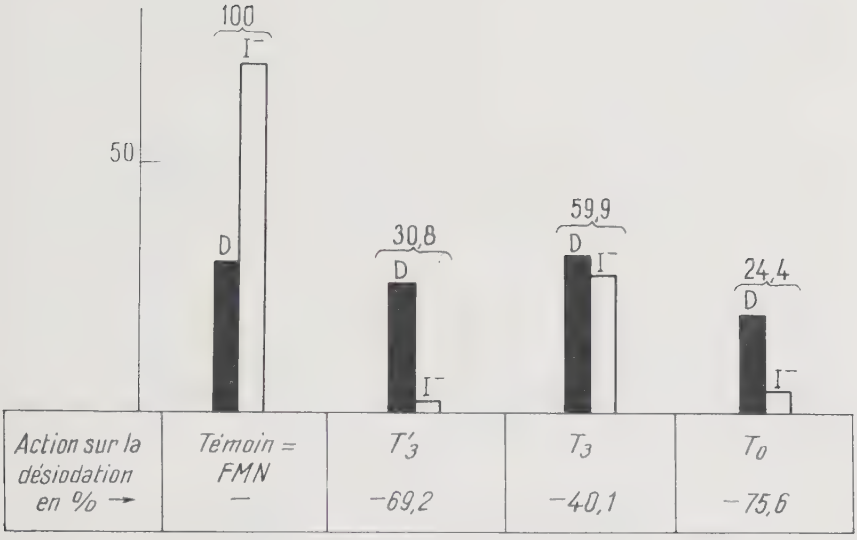


FIGURE 36

Action des thyroxines sur la teneur en ^{131}I et en ^{3}H du composé de Rf = 0

	^{3}H	^{131}I	$^{131}I/^{3}H$
Témoin = FMN	100	100	1
T'_3	28,6	86	3
T_3	49,2	100	2
T_0	34,5	65,8	2

DISCUSSION

La deuxième partie de notre travail a été consacrée à une étude cinétique des produits de la désiodation de T_4 et de T_3 marquées par ^{131}I et par ^{3}H. Nous avons incubé les iodothyronines avec des coupes et des homogénats de tissus, des mitochondries et une préparation purifiée de thyroxine-désiodase.

Dans le premier cas, avec des coupes et des homogénats de foie, de rein et de muscle, nous avons confirmé diverses observations antérieures : formation d'un certain nombre de métabolites plus ou moins bien définis tels que T_0, Tyr et des dérivés acétiques, et accumulation de matériel de Rf = 0 tritié et iodé (^{131}I), qui est le fait significatif essentiel.

Nous avons confirmé que l'activité désiodante se trouve concentrée dans les mitochondries et que son intensité est proportionnelle au volume de mitochondries utilisé. Les courbes cinétiques montrent très nettement que le produit principal de la désiodation demeure le composé de Rf = 0 tritié et iodé (^{131}I).

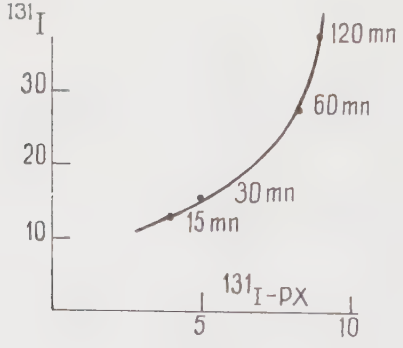


FIGURE 37

Evolution en fonction du temps (15, 30, 60, 120 mn) de la répartition de ^{131}I entre l'iodure et PX au cours de l'incubation de ^{131}I-T_4 avec les mitochondries de 150 mg de foie

Le rapport $^{131}I/^{3}H$, dans le corps de Rf = 0 (PX) est d'emblée très inférieur au rapport $^{131}I/^{3}H$ de la T_4 utilisée et évolue au cours de la désiodation entre 1/5 et 1/7 de cette valeur.

La *figure 37* montre la variation de ^{131}I présent dans PX par rapport à l'iodure ($^{131}I^{-}$) libre dans le milieu.

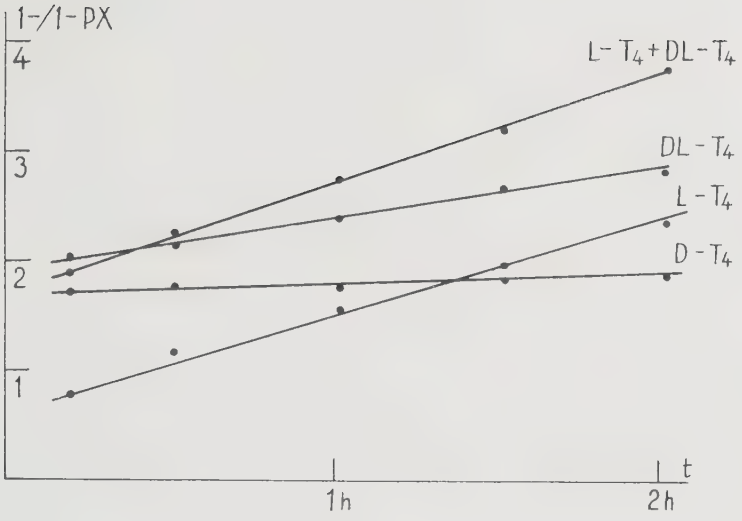


FIGURE 38

Evolution du rapport I^-/I-PX en fonction du temps lors d'une incubation de T_4 avec la thyroxine-désiodase

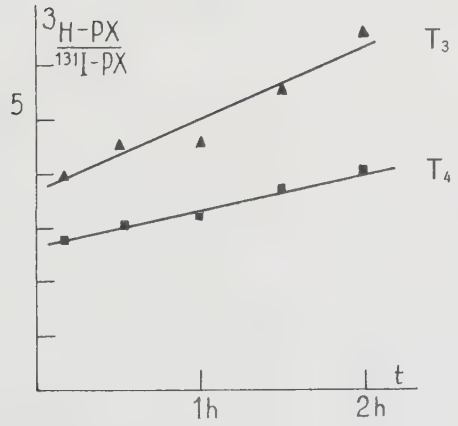


FIGURE 39

Evolution du rapport $^3H/^{131}I$ de PX au cours d'une incubation de T_3 et de T_4 doublement marquées avec de la thyroxine-désiodase

Ces résultats montrent que :

— PX contient de 22 à 12 % de l'iode contenu dans la T_4 étudiée ;

— la quantité d'iodure libéré croît proportionnellement plus que la teneur en iode de PX.

Dans le cas de l'enzyme, le seul corps tritié formé est PX : à chaque temps de la cinétique de désiodation de T_4 ou de T_3 tritiées, le pourcentage de PX correspond exactement à celui de l'iodothyronine disparue. PX renferme la totalité du tritium de l'iodothyronine désiodée et une partie seulement de l'iode, l'autre étant constituée par de l'iodure.

Les conclusions suivantes découlent de l'ensemble de nos résultats :

L'enzyme désiode avec une intensité comparable la DL-T_4, la D-T_4 et la L-T_4, mais les courbes traduisant l'évolution du rapport $^{131}I^-/^{131}I$-PX (*fig. 38*) sont des droites dont la pente dépend de la nature de l'isomère optique de l'iodothyronine. La pente est égale à 0,2 pour D-T_4, à 1,5 pour L-T_4 et à la moyenne de ces deux valeurs (0,8) pour DL-T_4. L'ordonnée à l'origine est plus faible pour L-T_4 que pour D et DL-T_4. La pente de la droite correspondant au mélange ^{131}I-L-T_4 et ^{3}H-DL-T_4 est la même que pour L-T_4, mais avec une ordonnée à l'origine égale à celle de D et DL-T_4.

Les courbes des rapports ^{3}H-PX/^{131}I-PX sont également des droites (*fig. 39*) traduisant la diminution en fonction du temps d'incubation, de la teneur en ^{131}I de PX et corrélativement une formation d'iodure.

En présence de mitochondries incubées avec T_4, T_3 et T_2 marquées par ^{3}H, PX se forme en quantité plus grande pour T_4 que pour T_3 et T_2.

Or T_2 marquée en 3,5 par ^{131}I est très peu désiodée par l'enzyme [68] et par les extraits salins des homogénats [89]. Ces observations montrent que la nature du composé de Rf = 0, que nous appelons d'une manière générale PX, n'a pas une composition fixe. Au cours de son métabolisme, trois phénomènes se succèdent :

— fixation de l'iodothyronine sur l'enzyme avec formation d'un complexe que nous appellerons PX_1 ;

— désiodation partielle de PX_1 en PX_2 et iodure ;

— désiodation lente de PX_2.

Cette hypothèse permet d'interpréter nos résultats sur l'évolution des rapports I^-/I-PX et ^{3}H-PX/^{131}I-PX : après fixation de l'iodothyronine sur l'enzyme (PX_1), puis désiodation partielle (PX_2), le produit obtenu continuerait de se désioder régulièrement en libérant de l'iodure minéral dans le milieu.

$Fe^{2}+$ active globalement la désiodation, donc aussi bien la formation d'iodure que celle de corps de Rf = 0. Quand on l'ajoute à FMN, il inhibe la désiodation de PX_2. Enfin, EDTA inhibe à la fois la formation de PX_1 et la désiodation de PX_2.

L'inhibition de la formation de PX par T_0 et la teneur élevée en iode de celui-ci, peuvent s'expliquer par un blocage du centre actif de l'enzyme dû à une compétition entre T_0 et T_4, conduisant à une absence de désiodation. L'inhibition de la désiodation de T_4 par T_3 et T'_3 correspondrait au même phénomène. De même, le fait que l'incubation de T_2 avec les mitochondries conduise à la formation de PX en quantité équivalente à celle obtenue avec T_3 bien que T_2 soit peu désiodée, rend compte de la formation de PX_1 par fixation de T_2 à l'enzyme.

L'inhibition par les réducteurs porte globalement sur la formation de PX et sur l'apparition d'iodure. On peut donc admettre qu'elle correspond à une action sur la formation de PX_1 qui serait, dès lors, due à un processus oxydatif intéressant vraisemblablement la fonction phénol des thyronines.

- III -

NATURE DES METABOLITES DE LA DESIODATION DE LA THYROXINE

Les résultats rapportés au cours des deux premiers chapitres de notre travail ont montré que le produit de la désiodation de T_4 et de T_3 « in vitro » n'est pas la thyronine mais un composé dont le Rf = 0 dans tous les solvants chromatographiques essayés : nous avons pu suivre l'apparition et l'accumulation de ce dernier corps au fur et à mesure de la désiodation.

Pour préciser le mécanisme de cette réaction, il était nécessaire d'obtenir des renseignements supplémentaires sur la nature du composé de Rf = 0 (PX). Pour cela, nous avons étudié le métabolisme du squelette carboné des thyronines et, par ailleurs, réalisé des modèles afin de préciser le rôle de FMN et l'action du pH sur la nature et la quantité des métabolites ; enfin, nous avons cherché à préciser la nature du ou des constituants radioactifs (^{131}I et ^{3}H) de PX.

I. — MÉTABOLISME DE LA THYRONINE

La thyronine inhibe à la fois la formation de PX_1 et sa désiodation, et prend parfois naissance, en quantité minime, par action de coupes de tissus sur T_3 ou T'_3. Nous avons étudié son métabolisme en soumettant à l'action des coupes de foie et de muscle de la ^{3}H-T_0 marquée dans les positions 3,5.

Des coupes de foie ou de muscle de rat (100 mg) sont placées dans une fiole de Warburg en présence de 0,5 ml de solution de Krebs-Ringer phosphaté (pH = 6,4) et de 0,3 μg d'^{3}H-T_0.

On les faits incuber à 37°C (60 secousses/minute, en présence d'air) pendant des temps variables, au bout desquels on prélève une partie aliquote (50 μl) du liquide d'incubation, que l'on soumet à la

chromatographie sur papier. L'analyse des produits en solution est complétée par celle des produits que renferment les coupes. Celles-ci sont homogénéisées en présence de solution de Krebs-Ringer phosphaté (pH = 6,4) et, après acidification à pH = 1, l'homogénat est extrait par le *n*-butanol. Les solutions obtenues sont évaporées sous pression réduite et l'extrait concentré est analysé par chromatographie sur papier.

— *Résultats :* incubation des coupes de foie avec ^{3}H-T_0 :

On peut identifier, par chromatographie sur papier (solvant : *n*-butanol - acide acétique - eau), de prises d'essai des milieux prélevées au bout d'une heure et demie, un corps de Rf = 0, Tyr, une certaine quantité de T_0 non transformée, un mélange des dérivés acétiques de T_0 : T_0A et de Tyr : TyrA, et deux dérivés d'hydroxylation : la 3'-OH-T_0 et la DOPA. La *figure 40* représente le radiochromatogramme correspondant, la *figure 41* un radioautogramme du même document. Par chromatographie en amylol tertiaire ammoniacal des mêmes milieux d'incubation étudiés au bout de trois heures, on identifie le corps de Rf = 0, TyrA, T_0 et son dérivé T_0A (*fig. 42*).

La chromatographie d'un extrait butanolique des coupes montre que T_0 n'est pas fixée par les tissus ; elle est, en effet, absente sur les chromatogrammes de cet extrait. Par contre, on retrouve dans ceux-ci T_0A, TyrA, Tyr, DOPA, 3'-OH-T_0 et surtout le corps de Rf = O.

Incubation de coupes de muscles avec ^{3}H-T_0. Les résultats obtenus sont analogues à ceux décrits dans le cas du foie. On peut en effet mettre en évidence, notamment, la présence de Tyr, de DOPA et de 3'-OH-T_0, aussi bien dans les liquides d'incubation que dans les extraits du tissu.

La L-Thyronine, acide aminé constituant le squelette carboné des hormones thyroïdiennes est métabolisée selon deux voies différentes, qui témoignent de l'existence de deux systèmes enzymatiques particuliers. Le premier processus est commun à tous les acides aminés et implique un catabolisme faisant intervenir des enzymes de désamination oxydative. Il conduit à la formation du dérivé acétique de la thyronine, éventuellement par l'intermédiaire du dérivé pyruvique. Un tel système intéresse également la tyrosine formée au cours du deuxième mécanisme du métabolisme de la thyronine et conduit à l'acide *p*-hydroxyphénylacétique.

Le deuxième processus est de nature oxydative : il implique la présence d'un matériel enzymatique vraisemblablement analogue à la polyphénoloxydase de champignon. Les corps formés sont successive-

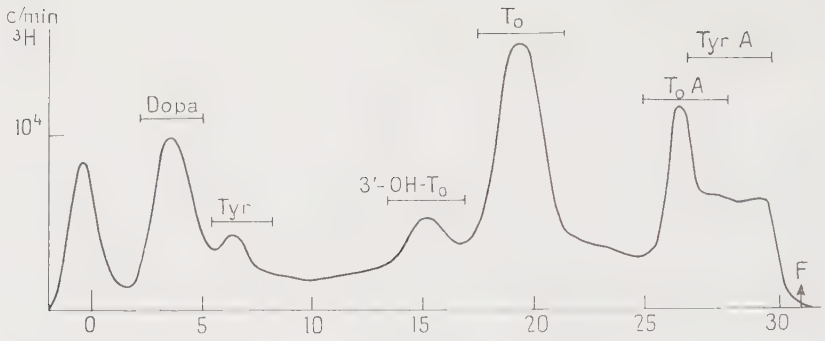


FIGURE 40

Radiochromatogramme d'un milieu d'incubation de ^3H-T_0 avec des coupes de foie (1,30 h à 37°). Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

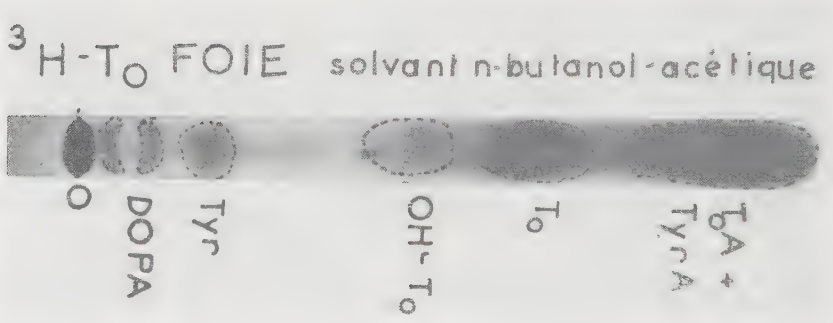


FIGURE 41 : Radioautogramme du même document que dans la *figure 40*

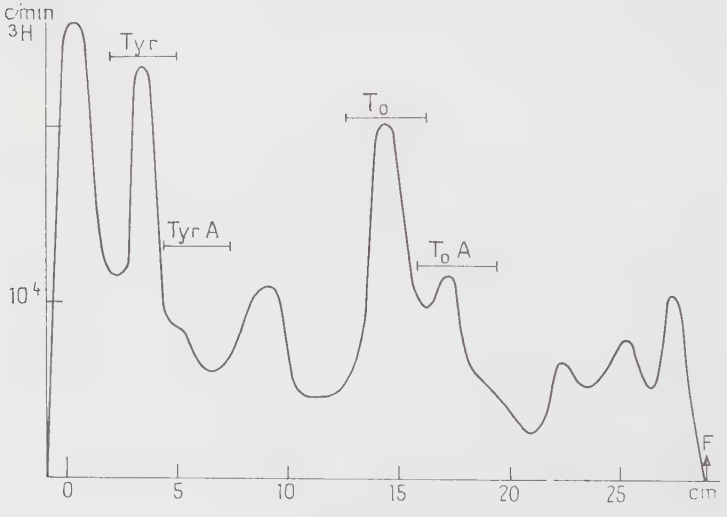


FIGURE 42

Radiochromatogramme d'un milieu d'incubation de ^3H-T_0 avec des coupes de foie de rat (3 h à 37°). Solvant : pentanol tertiaire saturé d'ammoniaque 2 N

ment : la 3' hydroxythyronine (3'-OH-T_0), la tyrosine (Tyr) et la dihydroxyphénylalanine (DOPA). Cette dernière a été également mise en évidence dans des milieux d'incubation de la 3,5-diiodo-L-tyrosine marquée par ^{14}C en présence des coupes de foie [66]. Le fait que ces trois dérivés prennent naissance milite en faveur du mécanisme proposé pour l'oxydation de thyronine par la polyphénoloxydase dont nous rappelons les étapes : *o*-hydroxylation, qui conduit à 3'-OH-T_0, formation de l'*o*-quinone suivie d'une hydrolyse et rupture du pont diphényl-éther avec production de Tyr ; cette dernière est à son tour métabolisée par les enzymes de désamination oxydative pour donner l'acide *p*-hydroxyphénylacétique.

La DOPA prend naissance soit directement à partir de T_0, soit par oxydation de la tyrosine. Le premier mécanisme est plus vraisemblable, car des essais effectués avec de la tyrosine marquée par le tritium n'ont pas permis d'identifier des quantités appréciables de DOPA [39].

L'ensemble des résultats peut être résumé dans le schéma suivant : notre attention a été retenue par la présence de matériel radioactif de Rf = 0 sur les différents chromatogrammes. Par analogie avec les résultats obtenus pour les iodothyronines et en raison de l'inhibition de la désiodation de T_4 par T_0, ce fait peut être interprété comme le résultat de la fixation de la thyronine sur l'enzyme. La formation de PX_1 est donc indépendante de la présence d'iode sur la molécule et ne dépend que de la structure-p-hydroxydiphényléther des thyronines. En effet les iodotyrosines et la tyrosine tritiées ne conduisent pas à la formation d'un corps de Rf = 0 [40], dans les mêmes conditions expérimentales.

II. — ÉTUDE DES MÉTABOLITES DE LA DÉSIODATION

1) *Action de FMN sur T_4*

Lissiszky et coll. [69] ont signalé la formation de DIT après action de FMN sur T_4 non marquée. Yamamoto et ses collaborateurs font la distinction entre la désiodation biochimique de T_4 sous l'action des systèmes enzymatiques, et sa désiodation chimique sous l'action propre de FMN [141, 142, 143].

Cette réaction semble sous la dépendance du pH : le taux d'iodure libéré augmentant fortement lorsque le pH atteint 8.

Nous nous sommes proposé de répéter cette expérience en utilisant de la thyroxine marquée simultanément par ^{3}H et par ^{131}I.

Nous avons réalisé quinze essais, dont la composition est rapportée dans le *Tableau XV*.

TABLEAU XV

	^3H - T_4 (10^{-5} M)	^{131}I - ^3H - T_4 (4 . 10^{-5} M)	FMN (5 . 10^{-5} M)	*pH*
1	+		+	4,9
2	+		+	6,0
3	+		+	6,7
4	+		+	7,9
5	+		+	9,5
6		+	+	4,9
7		+	+	6,0
9		+	+	6,7
8		+	+	7,9
10		+	+	9,5
11		+		4,9
12		+		6,0
13		+		6,7
14		+		7,9
15		+		9,5

L'incubation est poursuivie 2 heures à 37° avec illumination. Des prises d'essai sont analysées par chromatographie sur papier. Les comptages de ^{131}I nous ont permis de tracer la courbe de désiodation de T_4 en fonction du pH sous illumination en présence ou en absence de FMN (*fig. 43*).

Nous avons vérifié les résultats de YAMAMOTO et coll., de plus nous signalons que l'élévation de pH et la lumière suffisent à entraîner la désiodation de T_4.

Nous avons cherché à identifier le métabolite provenant de la désiodation de T_4, l'iodure étant seul marqué par ^{131}I.

Les radiochromatogrammes établis à partir des incubats de ^3H-T_4 renferment un corps ayant le Rf de T_4 et de petites quantités de DIT insuffisantes pour correspondre à la quantité d'iodure libéré au cours d'une incubation réalisée sur ^{131}I-T_4 au même pH (*fig. 44*). L'établissement de radiochromatogrammes en double marquage, obtenus avec ^{131}I-^3H-T_4 a permis d'établir l'existence d'un métabolite de désiodation de T_4 encore inconnu, parce que jusqu'ici indiscernable chromatographiquement de cette dernière (*fig. 45*).

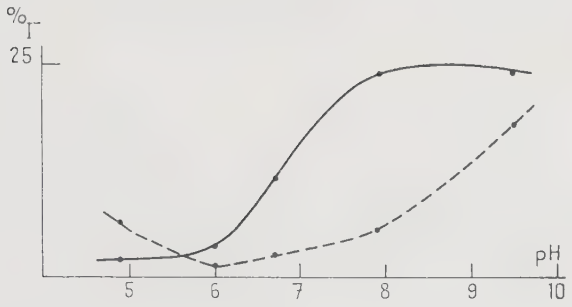


FIGURE 43

Désiodation de la thyroxine par incubation à 37° sous illumination, en fonction du pH, en présence (————) ou en l'absence (— — —) de FMN 5 . 10^{-5} M

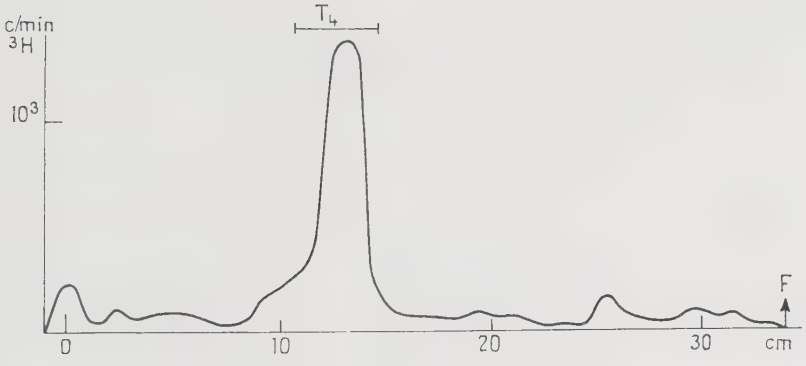


FIGURE 44

Radiochromatogramme d'un milieu d'incubation de ^{3}H-T_4 (10^{-5} M) avec FMN (5 . 10^{-5} M) à pH = 9,5 pendant deux heures sous illumination. Solvant : pentanol tertiaire saturé d'ammoniaque 2 N

Le seul moyen de le mettre en évidence a été de montrer que le rapport $^{131}I/^{3}H$ de ce corps est plus faible que celui de T_4. En l'absence de renseignements supplémentaires sur la nature de ce nouveau composé, nous le nommerons « Sosie de thyroxine ».

2) *Nature de PX*

a) Propriétés générales

PX, présent dans les milieux d'incubation des coupes, est essentiellement localisé à l'intérieur de celles-ci. On peut l'en extraire par le véronal sodique (pH = 8,6), après broyage.

La radioactivité de PX n'est pas dialysable contre eau ni contre véronal sodique. Les réactifs de précipitation des protéines : l'acide trichloracétique à 20 % (TCA), l'éthanol et le sulfate d'ammonium (concentration finale : 50 %) précipitent la radioactivité de PX, ^{131}I et ^{3}H. A partir du précipité trichloracétique il n'est pas possible par un lavage au n-butanol d'extraire des composés marqués par ^{3}H ; par contre la presque totalité de ^{131}I est soluble dans le butanol (*Tableau XVI*).

TABLEAU XVI

Extraction de ^{131}I de coupes de foie de rat incubées avec T_4 une heure à 37° :

T_4	10^{-7} M	après	4	extractions	butanoliques	il	reste	2,5 %	du	total
	10^{-4} M	»	»	»	»	»	»	2,1 %	»	»
	10^{-3} M	»	»	»	»	»	»	2,3 %	»	»

Extraction de ^{131}I du précipité trichloracétique du surnageant d'incubation des coupes :

T_4	10^{-7} M	après	4	extractions	butanoliques	il	reste	11,2 %	du	total
	10^{-4} M	»	»	»	»	»	»	2,4 %	»	»
	10^{-3} M	»	»	»	»	»	»	1,2 %	»	»

La migration chromatographique de PX est nulle dans tous les solvants employés ; qu'ils soient acides (butanol - acide acétique - eau), neutres (méthanol - acétate d'ammonium) ou alcalins (butanol ammoniacal, ter-pentanol ammoniacal). La tache de Rf = O n'est éluée ni par le méthanol ammoniacal, ni par l'ammoniaque au tiers ; par traitements alternés avec TCA 10 % puis *n*-butanol, la bandelette de papier cède au bout de trois extractions environ le tiers de la radioactivité de ^{3}H qu'elle contient.

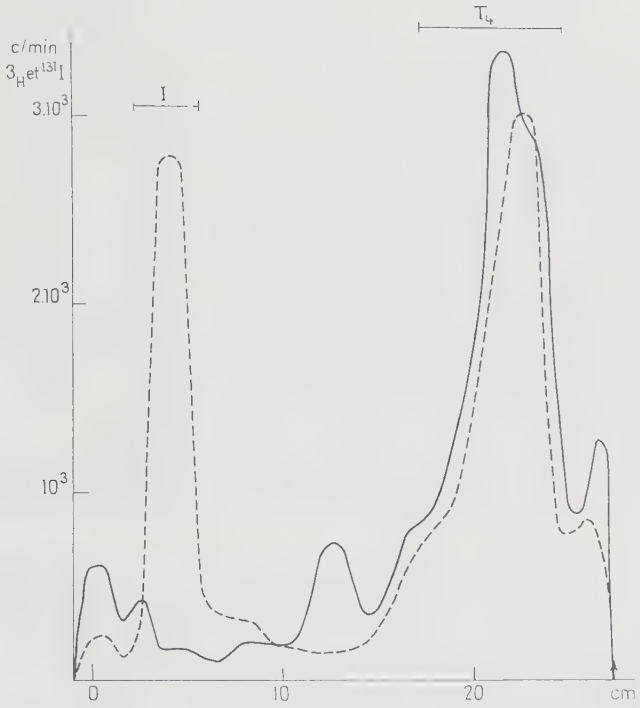


FIGURE 45

Radiochromatogramme établi en ^3H (————) et en ^{131}I (— — —) d'un milieu d'incubation de ^3H-^{131}I-T_4 (10^{-5} M) avec FMN ($5 . 10^{-5}$ M) à pH = 9,5 pendant deux heures sous illumination. Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

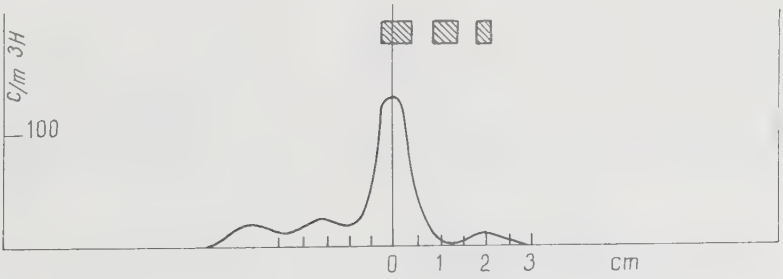


FIGURE 46

Radioélectrophorégramme sur papier estérifié (tampon véronal sodique, pH = 8,6, 400 v, 2,30 heures) du surnageant de 150 mg de coupes de foie de rat incubées 2 heures à 37°, puis 76 heures à 0° en présence de 7,5 μg de ^3H-T_4

Nous avons également étudié la migration électrophorétique de PX sur papier SCHLEICHER et SCHULL (15 heures, 1,2 mA) dans les conditions décrites pour la séparation des protéines tissulaires [120] et par électrophorèse sur papier estérifié (tampon véronal sodique 400 v., 2 heures 30). Dans les deux cas, nous avons constaté que la radioactivité est fixée sur les γ-globulines tissulaires (*fig. 46*).

Dans ces conditions il devenait légitime de penser à une liaison stable, éventuellement à l'incorporation de T_4 ou d'un de ses dérivés dans la protéine. Pour le démontrer, nous avons réalisé une hydrolyse trypsique ménagée du corps de Rf = O : 1 ml de l'incubat est traité par 2 mg de trypsine brute à pH = 8,5 pendant 96 heures ; nous avons prélevé des parties aliquotes d'hydrolysat partiel à des temps variables et analysé les corps formés. La *figure 47* illustre les résultats obtenus et traduit la libération progressive de corps marqués par le tritium.

b) ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES PRODUITS DE L'HYDROLYSE PROTÉINASIQUE DE PX

Incubation de ^3H-T_4 avec des coupes de foie

Nous avons incubé ^3H-T_4 (10^{-5} M) en présence de 300 mg de coupes de foie de rat en suspension dans 2 ml de solution de Krebs-Ringer carbonaté pH = 6,8 pendant 2 heures à 37° puis pendant 72 heures à 0°. Nous avons vérifié par chromatographie que le liquide surnageant de l'incubation des coupes ne contenait plus de T_4 libre et que le seul métabolite était PX, avant de l'hydrolyser par des enzymes pancréatiques totales.

Les produits obtenus par l'hydrolysat de 96 heures ont été analysés par chromatographie dans divers solvants. Il est possible d'identifier avec certitude DIT, de petites quantités de MIT et Tyr (*fig. 48*).

Le même hydrolysat trypsique a été étudié après hydrolyse complémentaire par la baryte à 8 % pendant 12 heures. Les résultats sont du même type à la différence près que l'action désiodante de la baryte [64] fait apparaître de plus fortes proportions de MIT et augmente corrélativement la proportion de tyrosine. Un corps inconnu est également présent sur les chromatogrammes des deux types d'hydrolysats.

Incubation de ^3H-T_4
avec une préparation purifiée de thyroxine-désiodase

50 μg de ^{3}H-T_4 dissous dans 5 ml de solution de Krebs-Ringer sont soumis à l'action de 20 mg d'enzyme dissous dans 20 ml de Krebs-Ringer en présence de 25 ml d'une solution 10^{-4} M de FMN dans le Krebs. L'incubation a été poursuivie pendant 6 heures à 37°.

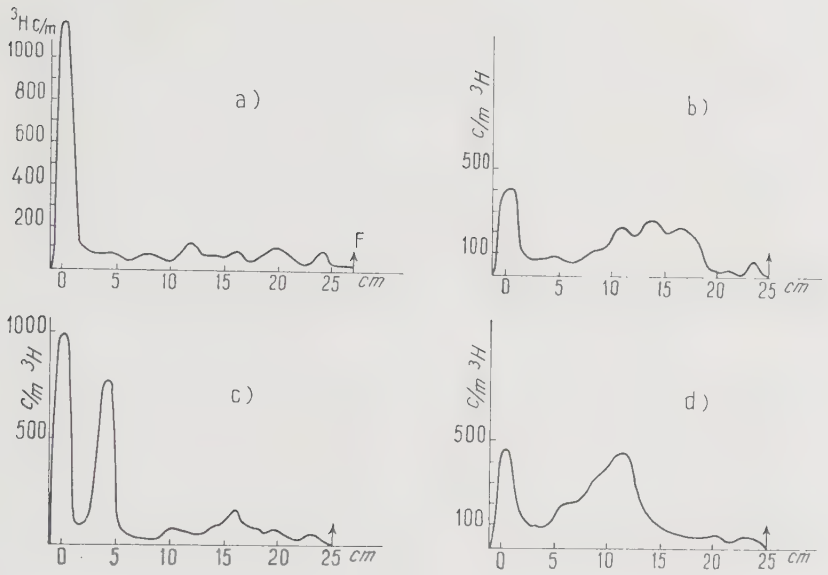


FIGURE 47

Radiochromatogramme du surnageant de 150 mg de foie de rat incubés 2 heures à 37°, puis 76 heures à 0° et hydrolysé par la trypsine brute pendant des temps variables : *a*) temps zéro ; *b*) temps 30 minutes ; *c*) temps 6 heures ; *d*) temps 24 heures. Solvant : n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

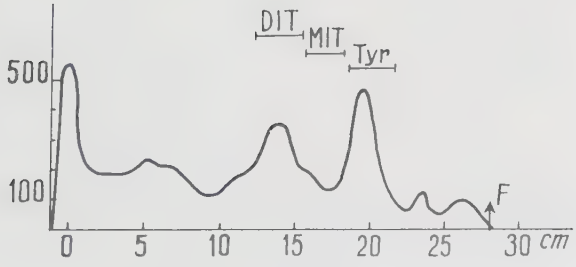
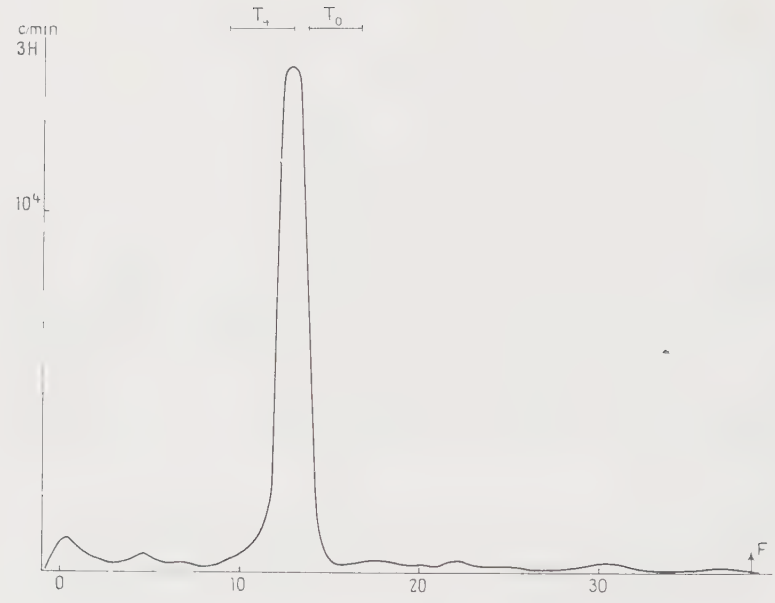


FIGURE 48

Radiochromatogramme de l'hydrolysat trypsique de 96 heures du surnageant de coupes de foie de rat incubées en présence de ^{3}H-T_4. Solvant : méthanol, acétate d'ammonium 0,2 M (1, 2,5)



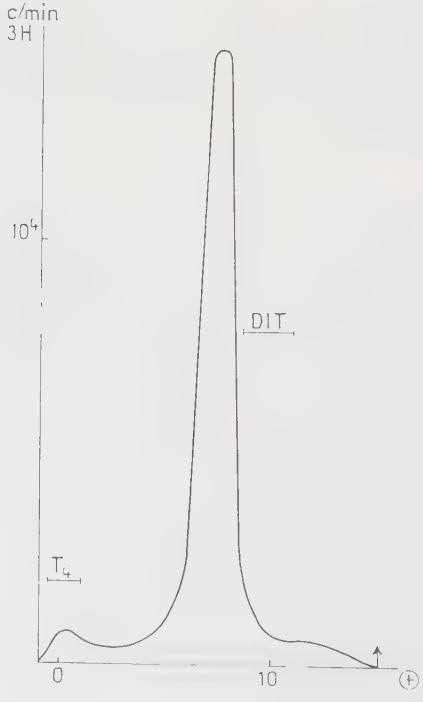


FIGURE 49 (*ci-dessus*)

Radiochromatogramme d'un hydrolysat trypsique de ^{3}H-PX dans le solvant pentanol tertiaire saturé d'ammoniaque 2 N

FIGURE 50 (*ci-contre*)

Electrophorégramme en tampon carbonate d'ammonium 0,05 M d'un hydrolysat trypsique de PX

A la fin de l'incubation, l'enzyme est précipitée, on la sépare par centrifugation. Le précipité est lavé à l'eau puis traité par des enzymes pancréatiques totales pendant 96 heures à 37°.

On vérifie que le liquide surnageant ne précipite plus par le sulfate d'ammonium à la concentration finale de 50 %.

L'hydrolysat est analysé par chromatographie sur papier : il ne renferme qu'un seul composé tritié ayant dans plusieurs solvants un Rf voisin de celui de T_4 (*fig. 49*).

Nous avons cherché à préciser d'autres caractères analytiques de ce composé, par électrophorèse sur papier en tampon carbonate d'ammonium 0,05 M pendant 5 heures. Il effectue une migration de 8 cm alors que T_4 témoin demeure sur la ligne de dépôt (*fig. 50*).

Nous l'avons également réduit par le nickel de Raney en milieu ammoniacal ; nous avons identifié le produit de la réaction comme étant de la tyrosine.

Ces deux observations apportent deux arguments pour affirmer que le corps présent dans PX n'est pas T_4.

Incubation de ^{131}I-^3H-T_4
avec une préparation purifiée de thyroxine-désiodase

Pour nous assurer que ce composé n'était pas T_4, nous avons répété la même expérience en utilisant comme substrat de la thyroxine marquée à la fois par ^{131}I et par ^3H.

Le double comptage d'un chromatogramme dans le solvant butanol acétique rend compte du fait qu'il ne peut s'agir de T_4. En effet la comparaison entre les activités spécifiques correspondantes montre que ce corps nouveau malgré sa similitude de Rf avec T_4 renferme moins d'iode que celle-ci. Il peut s'agir d'un corps ne contenant pas d'iode radioactif lié à de petites quantités d'iode sous forme ionique : nous considérons qu'il s'agit de « Sosie de T_4 » rencontré plus haut (*fig. 51*) et nous discuterons de sa nature probable dans la conclusion.

Par ailleurs nous avons pu identifier sur ce même chromatogramme de petites quantités d'iodure radioactif, de DIT et de Tyr marquées par ^3H.

Le « Sosie de T_4 » est instable, il se décompose spontanément en solution en libérant des quantités de plus en plus importantes de DIT uniquement marquée par ^3H et d'iodure radioactif (*fig. 52*).

Nous avons confirmé la nature de DIT par chromatographie dans différents solvants (méthanol-acétate d'ammonium, élution d'un chromatogramme en *ter*-pentanol ammoniacal et rechromatographie dans le solvant butanol acétique).

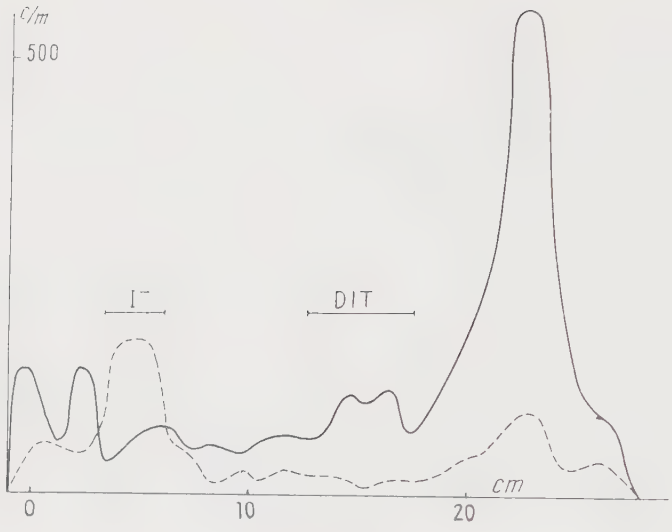


FIGURE 51

Radiochromatogramme * d'un hydrolysat trypsique de ^{3}H-^{131}I-PX dans le solvant n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17)

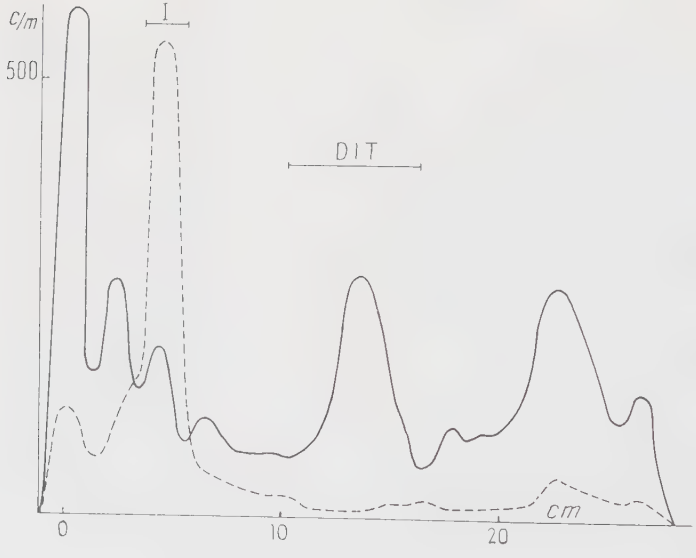


FIGURE 52

Radiochromatogramme * du même hydrolysat après décomposition spontanée d'une partie de Sosie de T_4

* Comptages de ^{3}H en traits pleins, comptages de ^{131}I en pointillés avec des ordonnées sept fois supérieures pour que les dessins aient plus de clarté.

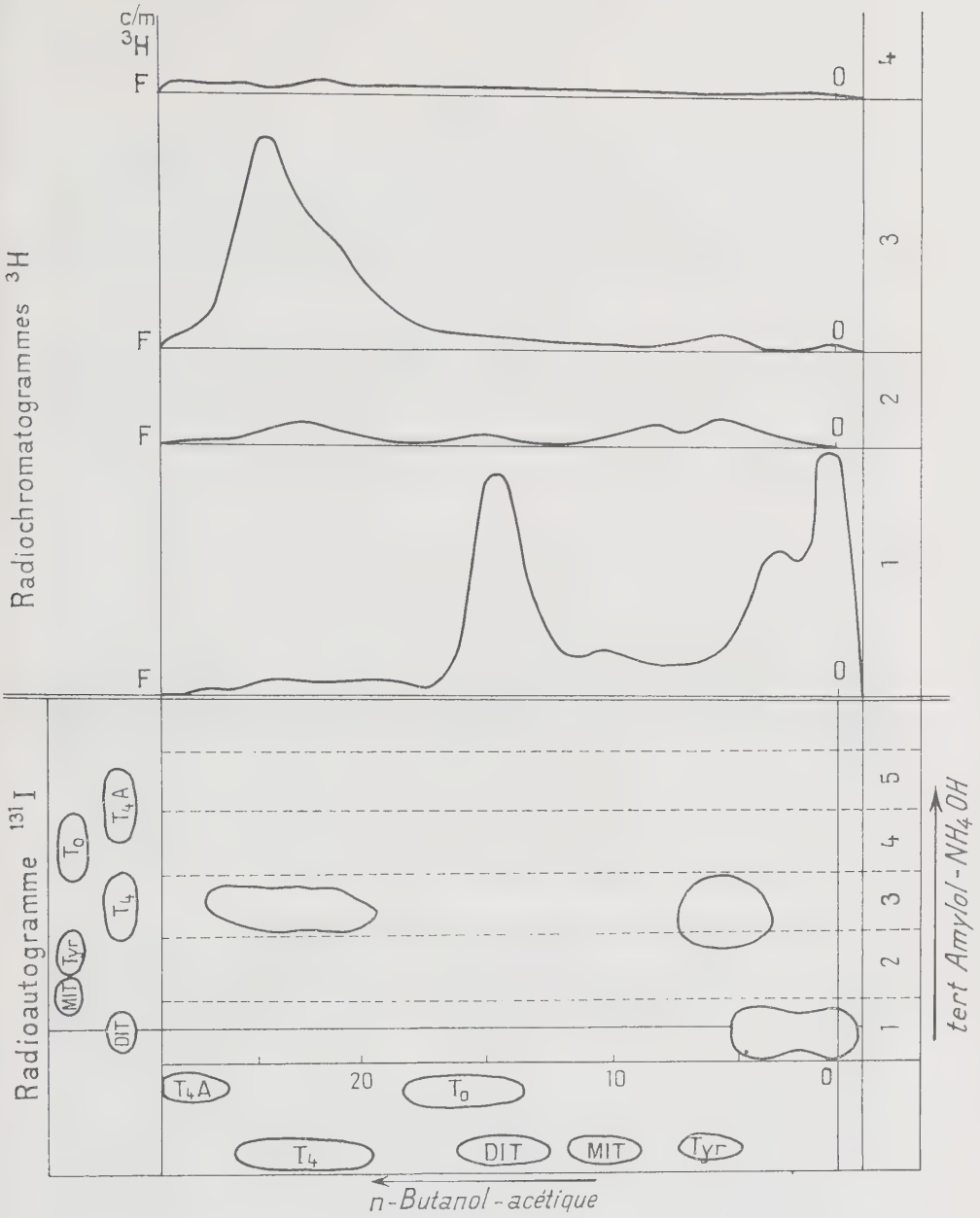


FIGURE 53

Chromatogramme bidimensionnel d'un hydrolysat trypsique du complexe protéique (PX) obtenu après incubation de ^3H-^{131}I-T_4 en présence de thyroxine-désiodase, pendant six heures à 37°. Solvants : première dimension n-butanol, acide acétique, eau (78, 5, 17); deuxième dimension pentanol tertiaire saturé d'ammoniaque 2 N.

a) Radioautogramme des produits marqués par ^{131}I. La position des témoins latéraux dans les deux dimensions est indiquée sur le schéma.

b) Radiochromatogrammes des produits marqués par ^3H. Le chromatogramme bidimensionnel a été découpé parallèlement à la première dimension en cinq bandes, qui correspondent à la position des témoins latéraux dans la seconde dimension. Chaque bande a été comptée séparément cm par cm (*en ordonnée :* c/mn ^3H ; *en abscisse :* longueur du chromatogramme).

Nos résultats se trouvent résumés dans un chromatogramme bidimensionnel butanol acétique/*ter*-pentanol ammoniacal (*fig. 53*). ^{131}I a été repéré par comptage de la première dimension (butanol acétique) et radioautographie: ^{3}H a été compté en scintillation liquide après découpage centimètre par centimètre de pistes parallèles à la première dimension.

Par sommation des impulsions enregistrées sur des centimètres homologues des cinq bandes, on peut calculer les pourcentages des différents constituants tritiés et les comparer à ceux des constituants iodés établis à partir du radiochromatogramme de la première dimension.

DISCUSSION

1° Bien que T_0 ne soit pas le métabolite principal de la désiodation, nous avons étudié sa dégradation par les tissus. Nous avons montré que des systèmes d'oxydation agissent sur le squelette carboné des thyronines et qu'il se forme de la DOPA, du 3'OH-T_0 et du matériel de Rf = 0.

2° Si on étudie l'action de FMN sur T_4 marquée en α-β par ^{3}H et en 3', 5' par ^{131}I, en l'absence de matériel enzymatique, on démontre qu'il se forme DIT marquée par ^{3}H et non par ^{131}I.

3° Une hydrolyse enzymatique poursuivie sur PX (matériel de Rf = 0) obtenu par incubation de ^{131}I-^{3}H-T_4 avec la thyroxine-désiodase, fournit les mêmes résultats : formation de DIT marquée seulement par ^{3}H et provenant donc de la coupure du pont phénoxydique.

Ces observations sont en contradiction avec la « transiodation », mécanisme proposé par Tata pour expliquer la formation au cours de la désiodation de matériel de Rf = 0 contenant ^{131}I : l'iode quitte la molécule d'iodothyronine sous forme de I^+ ou I^0, susceptible alors d'ioder les restes de tyrosine des protéines du milieu [124]. Lissitzky, Benevent et Roques soutiennent cette hypothèse, mais identifient de la monoiodohistidine (MIH) après hydrolyse de PX [68]. Cependant ces mêmes auteurs ont caractérisé DIT après incubation de T_4 non marquée avec FMN [69].

Nos résultats sont en accord avec ceux de Plaskett [89] qui identifie DIT marquée par ^{131}I après incubation de T_4 marquée en 3,5 par ^{131}I avec un système désiodant [77] très différent de ceux que nous avons utilisés.

FMN a le même effet qualitatif employé seul à pH 8,5-9 ou en présence de thyroxine-désiodase à pH 6,8 : l'enzyme permet à la réaction de s'effectuer à des pH physiologiques avec des rendements meilleurs. Nous avons montré que le métabolite principal de T_4 est dans les deux cas « sosie de T_4 », c'est-à-dire un corps qui renferme la totalité de ^3H, mais seulement une faible partie de l'iode initialement présent sur T_4. Dans le cas de FMN employé seul, « sosie de T_4 » est libre et se décompose en DIT libre et I^-. Avec le milieu complet, FMN et enzyme, « sosie de T_4 » lié à du matériel protéique n'en est libéré que par hydrolyse ; il cesse alors d'être stabilisé par cette liaison et se décompose en DIT et I^-. Cette stabilité des atomes d'iode en position 3,5 est en contradiction avec l'hypothèse de Lissitzky, Benevent et Roques [68] : les atomes d'iode en 3,5 partent en un premier temps avec une vitesse faible, les atomes en 3',5' pouvant alors être aussitôt enlevés. Ces auteurs expliquent ainsi l'absence de métabolites de désiodation partielle et la formation de T_0. Or, nous l'avons montré, T_0 ne se forme qu'en petites quantités dans les coupes et pas du tout avec les systèmes purifiés. Cependant, ce mécanisme pourrait constituer une voie latérale et être responsable de la présence de ces petites quantités de T_0. Le mécanisme principal est la rupture du pont phénoxydique avec formation de DIT, après départ des atomes d'iode en 3',5' d'une molécule de T_4 liée à la protéine enzymatique.

DISCUSSION GENERALE

Les coupes et les homogénats de tissus désiodent les hormones thyroïdiennes, mais il est difficile d'établir un bilan de la déshalogénation en leur présence. La répartition des constituants iodés entre les coupes et le milieu d'incubation est inégale : les premières renferment la plus grande partie des hormones fixées à une protéine cellulaire TBP_c [120], le second s'enrichit progressivement en iodure. Mais la sélectivité de la répartition des uns et des autres entre tissus et milieu d'incubation n'est pas absolue ; une partie non négligeable de l'iodure se trouve en effet retenue dans les coupes. L'homogénat désiode moins que les coupes, car la libération de la TBP_c dans le milieu protège l'hormone vis-à-vis de l'enzyme désiodante. Enfin, nous avons confirmé que l'activité désiodante est contenue essentiellement dans les mitochondries.

On peut envisager la succession des quatre réactions suivantes :

1) $T_4 + TBP_s \rightleftharpoons T_4 \quad TBP_s$
2) $T_4 - TBP_s + TBP_c \rightleftharpoons T_4 - TBP_c + TBP_s$
3) $T_4 - TBP_c + PM \rightleftharpoons T_4 - PM + TBP_c$
4) $T_4 - PM + E \rightleftharpoons T_4 - E + PM$

où :

TBP_s = Protéines sériques qui fixent T_4
TBP_c = Protéines cellulaires qui fixent T_4
PM = Protéines mitochondriales
E = Thyroxine-désiodase

Il existe dans le sérum, le cytoplasme et les mitochondries des systèmes protéiques plus ou moins complexes capables de fixer les hormones thyroïdiennes. Certains semblent jouer un rôle de transporteurs (1), le transport de T_4 pouvant assurer sa protection (2); pour d'autres (3), on sait seulement qu'ils fixent T_4 sans qu'on puisse les identifier avec certitude au dernier système (4), l'enzyme désiodante. Il serait nécessaire de purifier ces systèmes et de préciser leur affinité pour T_4, leurs concentrations respectives et le mécanisme de leur action, comme il a été fait dans le cas des protéines des tumeurs

d'ascite ou bactériennes [111]. L'orientation des recherches vers la localisation des hormones thyroïdiennes à l'intérieur des cellules et dans le cadre de leurs relations avec divers systèmes protéiques, nous semble très intéressante. L'autant que la désiodation s'opère au sein d'un système protéique dans lequel les produits de la réaction restent inclus, comme le montrent nos résultats.

L'étude du mécanisme de la désiodation des hormones thyroïdiennes par les coupes et les homogénats est d'autant plus difficile que les produits du métabolisme cellulaire ne sont pas d'un seul type : parallèlement à la désiodation, une série de réactions intéresse la chaîne alanine avec formation de dérivés acétiques, eux-mêmes susceptibles d'être désiodés. De plus, nous avons signalé la présence inconstante de tyrosine marquée par ^{3}H, qui s'explique par une coupure du pont phénoxydique après ou avant le départ des atomes d'iode en position 3,5. Dans le dernier cas, on doit admettre la présence transitoire de DIT, elle-même très rapidement désiodée par les coupes en MIT, puis en tyrosine [66], ou dégradée en dérivés acétiques des acides aminés correspondants. Si de la thyronine se forme, elle est susceptible de conduire à la tyrosine, à des dérivés acétiques et d'être oxydée en 3'-OH T_0 et DOPA. On se trouve donc, avec les coupes et les homogénats, en présence de plusieurs phénomènes dus à des systèmes complexes : 1) liaison des hormones à des protéines de transport, de protection ou enzymatiques ; 2) désiodation, qui a pour conséquences la diffusibilité partielle de l'iodure dans le milieu et les équilibres de formation de complexes T_4-protéines et de répartition de ces derniers entre les structures cellulaires et le milieu d'incubation ; 3) réactions intéressant les métabolites : modification de la chaîne alanine et désiodation des dérivés, coupure du pont et désiodation des iodotyrosines libérées, métabolisme propre de la thyronine. Nous avons cependant constaté que, dans les coupes et les homogénats, le produit principal de l'incubation est un constituant iodé (^{131}I) et tritié associé à du matériel protéique, qui s'accumule dans le milieu.

Pour réduire le nombre des paramètres, nous avons étudié les propriétés désiodantes de fractions cellulaires. Les mitochondries renferment pratiquement la totalité de l'activité. Celle-ci est très faible dans la fraction surnageant-microsomes, contrairement aux observations d'autres auteurs [121]. Ce désaccord peut provenir de différences de méthode de préparation (fractions centrifugées dans le saccharose 0,25 M au lieu de solutions salines). Dans le cas des mitochondries, la désiodation est proportionnelle à la quantité de particules introduite dans le milieu ; la fixation de la thyroxine par les protéines mitochondriales n'est donc pas du type « protecteur ».

Les produits de la désiodation sont toujours l'iodure et le matériel de nature protéique (PX) qui renferme de l'iode (^{131}I) et du tritium ; leur quantité croît en fonction du temps. Il se forme cependant de petites quantités de dérivés acétiques.

Les recherches sur la désiodation par l'enzyme montrent que PX s'accumule dans le milieu : à tout moment, PX contient la totalité du tritium de l'iodothyronine métabolisée, il ne renferme qu'une partie de plus en plus faible de l'iode initialement présent, le reste étant libéré sous forme d'iodure. Ce phénomène peut signifier :

1° Que PX produit aux temps courts de la désiodation est plus riche en iode que celui que l'on trouve en fin de réaction.

2° Que dans un premier temps PX est formé par union de T_4 et d'une protéine (PX_1) ; puis que dans un temps suivant $PX_1 \longrightarrow PX_2 + I^-$, ce qui aboutit à un PX moins iodé que l'iodothyronine.

3° Qu'il existe des étapes dans la désiodation et que PX contient à chaque instant un mélange d'iodothyronines de moins en moins iodées.

Cette dernière possibilité ne doit pas être retenue ; en effet, nous n'avons pas trouvé dans les expériences « in vitro » d'iodothyronines partiellement halogénées. Toutefois, Lissitzky, Benevent et Roques [68] signalent que l'addition de T'_3 ou T''_2 non marquées (10 mμM) au milieu d'incubation s'accompagne de la présence de petites quantités de T'_3 ou T''_2 marquées. La désiodation suivrait donc la voie suivante :

$$T_4 \xrightarrow{k_1} T'_3 \xrightarrow{k_2} T''_2 \xrightarrow{k_3} T_0, \text{ avec } k_3 > k_2 > k_1$$

ce qui expliquerait l'absence de dérivés partiellement désiodés dans les expériences « in vitro » et impliquerait que les atomes d'iode dans les positions 3,5 partent les premiers, bien que moins labiles.

Au contraire, Plaskett a montré que le pourcentage d'iodure marqué libéré à partir de 3,5-^{131}I-T_4 est très inférieur à celui obtenu lors de la désiodation de 3'5'-^{131}I-T_4 [89]. De plus, le schéma proposé par Lissitzky, Benevent et Roques implique la thyronine comme terme ultime de la désiodation ; or, nous l'avons montré, celle-ci ne se forme qu'en très faible quantité ; on ne la trouve pas dans PX et sa présence fortuite dans les coupes doit être interprétée comme liée à une réaction secondaire peu importante. Ce fait remarquable permet de distinguer radicalement la désiodation des iodothyronines de celle des iodotyrosines, qui conduisent à la tyrosine quand elles sont incubées avec des coupes [39, 40].

Par ailleurs, si l'on compare l'action des mitochondries ou de l'enzyme sur T_4, T_3 et T_2, on constate que les taux de formation de PX sont comparables avec les trois thyronines, pour une même expé-

rience, bien que la vitesse de désiodation de T_2 soit moindre que celle de T_4 et T_3 [68]. Cette observation témoigne de la stabilité des atomes d'iode sur les positions 3,5. Le taux de ^{3}H-PX est donc moins l'indice de la désiodation que celui de la fixation des iodothyronines à une protéine. De plus T_0, bien que dépourvue d'iode, conduit à la formation de PX : ce fait peut donc être considéré comme une propriété des thyronines. A la différence des iodotyrosines, les thyronines sont donc liées à une protéine, probablement après oxydation de la fonction phénol. Remarquons que l'action de FMN seul sur une thyronine ne conduit pas à la formation de quantités importantes de matériel de Rf = 0. Les trois observations suivantes étayent l'hypothèse de l'oxydation du phénol. L'étude du métabolisme de T_0 a montré qu'il existe dans la cellule des mécanismes d'oxydation des thyronines, alors que de tels processus ne peuvent être mis en évidence avec certitude dans le cas des iodotyrosines [39]. Les réducteurs (PTU, cys, SO_3H^-) inhibent la désiodation de T_4 en empêchant la formation de PX ; les thyronines (T_0, T_3, T'_3) ont le même effet et, de plus, bloquent la désiodation de PX. Nous pouvons donc conclure que les thyronines sont dans un premier temps fixées à l'enzyme par le phénol pour former PX_1 et que cette fixation a lieu après oxydation de la fonction phénol.

Remarquons maintenant que PX est constitué par une protéine qui fixe tout le squelette carboné des thyronines. Le tritium ainsi fixé n'est pas extractible par les solvants organiques, mais l'iode radioactif qu'il renferme l'est en grande partie : Lissitzky, Benevent et Roques [68] signalent également que la plus grande partie de ^{131}I contenu dans PX est séparée par passage sur une colonne de Sephadex. Par contre, une molécule tritiée ne peut être libérée du complexe protéique que par protéolyse prolongée. Le produit de l'hydrolyse occupe sur les chromatogrammes dans plusieurs solvants le Rf de la thyroxine ; seule la migration électrophorétique diffère. Ce corps, qui contient la totalité du tritium de T_4, ne renferme qu'une très faible fraction de ^{131} initialement présent. Par réduction catalytique avec le nickel de Raney, il conduit à la tyrosine ; par décomposition spontanée, il fournit en proportions équivalentes de l'iodure radioactif et de la DIT marquée par ^{3}H, mais non par ^{131}I.

Ces résultats méritent d'être commentés. Dans une hypothèse de Niemann [83], T_4 agirait après transformation en semi-quinone. Lein [63], reprenant cette hypothèse, a montré que le spectre U.V. des iodothyronines est modifié sous l'action de la lumière et a interprété ce fait par la formation d'une semi-quinone.

L'équilibre $T_4 \rightleftharpoons T_4$ oxydée rendrait alors compte de l'intervention de l'hormone dans des processus de transport d'hydrogène.

Dans le cadre de cette hypothèse, la formation de PX_1, association de T_4 avec une protéine, pourrait s'écrire :

$$T_4 + \text{Enzyme} + \text{FMN} \rightleftharpoons (T_4 \text{ oxydée-Enzyme}) + FMNH_2$$

La forme oxydée de la thyroxine serait relativement stabilisée par la liaison avec l'enzyme, l'iode en ortho de la fonction quinone est alors libéré : il se forme PX_2. Nous possédons quelques éléments sur sa nature probable et sur le mécanisme de sa formation.

Nous sommes partis de T_4 renfermant deux atomes de ^{131}I pour deux atomes de ^{3}H ; le produit final, obtenu par hydrolyse de PX après six heures d'incubation, n'a pas perdu ^{3}H mais ne contient qu'une très faible fraction de ^{131}I. Or, il n'est possible de séparer qu'un seul fragment tritié et désiodé (« sosie de T_4 »). Dans l'état actuel de nos recherches, aucune des trois hypothèses que nous avons formulées ne recouvre vraisemblablement les faits. PX_2, à un stade ultime contenant encore une faible fraction de ^{131}I, se décompose en quantités proportionnellement équivalentes de ^{3}H-DIT et d'iodure ($^{131}I^-$). Nous pouvons supposer qu'il s'agit d'un composé contenant encore les deux cycles du squelette des thyronines avec la chaîne alanine intacte. Mais l'on ne peut envisager l'existence d'une molécule sur laquelle on ne trouverait qu'une fraction d'atome d'iode lié par une liaison covalente. On pourrait concevoir un polymère, mais, compte tenu de la faible teneur en iode, il devrait contenir au bout de six heures d'incubation jusqu'à 70 atomes de ^{3}H pour 2 de ^{131}I, ce qui rend son existence peu vraisemblable. De plus, en quatre extractions butanoliques, ^{131}I est séparé en presque totalité de PX dénaturé par TCA. L'extraction est cependant plus laborieuse que celle de l'iodure pour lequel un seul lavage suffit. Il reste donc une hypothèse, c'est que « sosie de T_4 » a conservé les deux cycles des thyronines et que l'iode est fixé sur le radical libre de la semi-quinone produite dans le premier temps de l'oxydation. On comprendrait dès lors que l'iode soit labile et que son départ s'accompagne de la coupure du pont phénoxydique et de libération de DIT.

Le *Tableau XVII* donne un schéma de cette hypothèse.

La formule proposée pour « sosie de T_4 » peut être comparée à celle d'un intermédiaire instable postulé par Johnson et Tewkesbury [57] dans leur schéma de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes à partir de la diiodotyrosine (I) (*Tableau XVIII*) :

— Oxydation de celle-ci en radical libre (II).

— Condensation de deux molécules de radical libre conduisant à la formation d'un éther quinolique instable (III).

— Perte de la chaîne latérale fixée sur la diénone conduisant à la thyroxine (IV).

TABLEAU XVII

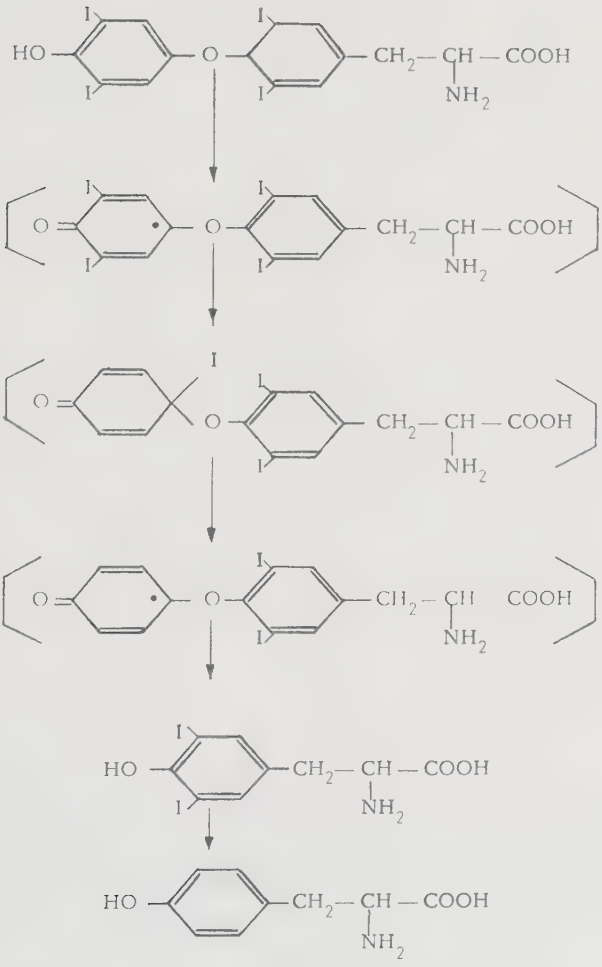


TABLEAU XVIII

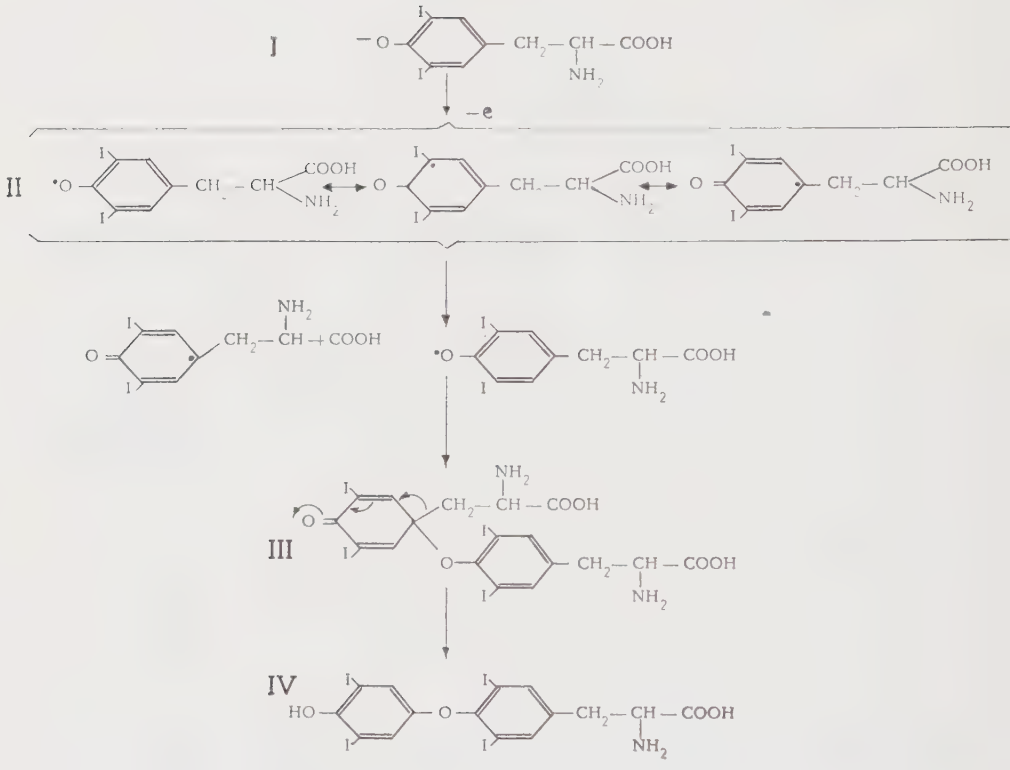
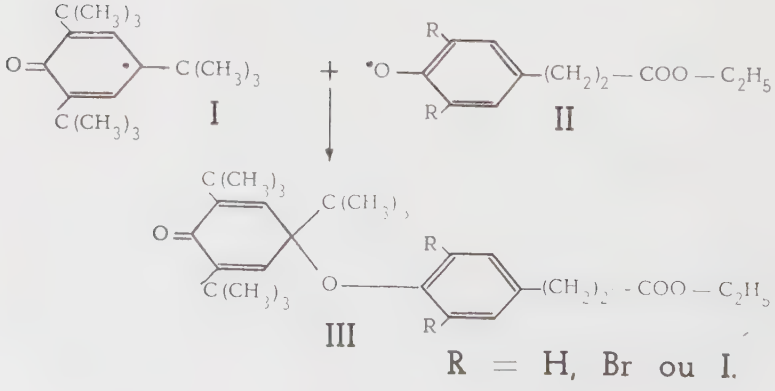


TABLEAU XIX

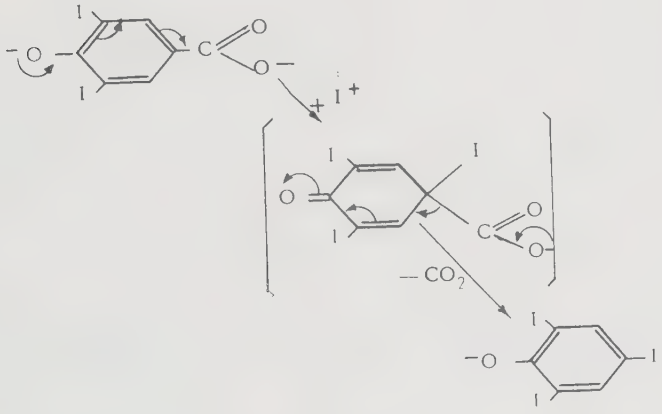


R = H, Br ou I.

Dans des travaux ultérieurs, CAHNMANN et MATSUURA [80] ont préparé un radical libre du même type, mais stable (I) (Tableau *XIX*), qui conduit par condensation sur un analogue de tyrosine (II) à un éther quinolique dont la stabilité varie avec la nature des substituants en 3,5 (R = H, Br ou I). Si R = I, l'éther est très instable, il ne conduit jamais à l'analogue de thyroxine et se décompose en régénérant les produits de départ.

Par ailleurs, les mêmes auteurs [79] ont montré l'iodation secondaire d'un composé radicalaire, par de l'iode fourni par désiodation d'une partie du matériel de départ (*Tableau XX*).

TABLEAU XX



Ces diverses observations permettent d'envisager la formation au cours de la désiodation d'un éther quinolique secondairement iodé (« sosie de T_4 ») qui se décomposerait à la manière d'un éther α-halogéné ou par départ de I en régénérant de l'iodure minéral, de la DIT et probablement de la *p*-quinone.

Cette hypothèse permet d'expliquer la présence de tyrosine tritiée dans les incubats de coupes ; la DIT formée peut en effet être désiodée par l'iodotyrosine-désiodase [66], dont l'activité est considérable. La présence de faibles quantités de Tyr et de MIT dans l'hydrolysat de PX obtenu avec la thyroxine-désiodase, est explicable si l'on pense que cette enzyme possède une certaine activité désiodante vis-à-vis des iodotyrosines [68].

Nos résultats ne confirment pas ceux de TATA [125] et sont en contradiction avec l'hypothèse de la transiodation ; en effet, nous ne trouvons pas dans PX de DIT ou MIT marquées par ^{131}I. La différence fondamentale avec les conclusions de TATA ou de GALTON et INGBAR [34] provient du fait que ces auteurs estiment que PX ne contient que de l'iode radioactif et pas le squelette carboné de T_3 et de T_4 comme nous l'avons montré.

Par contre, nos résultats sont en accord avec ceux de PLASKETT [89]. Un dernier point mérite d'être discuté, c'est celui d'une éventuelle relation entre le processus de désiodation et l'activité hormonale. Nous retiendrons simplement quelques arguments en faveur d'une telle relation :

— L'accord de nos observations avec l'hypothèse de NIEMANN qui implique une forme oxydée de la thyroxine pouvant jouer un rôle dans les processus de transport d'hydrogène.

— Les différences dans le mécanisme d'action de l'enzyme sur les formes D et L de T_4 et de T_3 : si l'intensité de la déshalogénation est globalement comparable pour les inverses optiques, par contre le processus de désiodation de PX est différent.

— Les iodotyrosines dépourvues d'activité hormonale ne donnent pas naissance à PX mais à la tyrosine.

Deux hypothèses peuvent être formulées en ce qui concerne le rôle biologique de la déshalogénation de la thyroxine :

— La désiodation donnant naissance à des produits inactifs (iodure, DIT) est un processus purement dégradatif correspondant à l'élimination de l'hormone, indépendamment de son action.

— Désiodation et activité sont deux manifestations d'une même réalité biochimique dont une protéine constitue le support.

Nous penchons plutôt vers la seconde, mais des données expérimentales supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir conclure. Nos résultats permettent cependant de relier l'hypothèse de NIEMANN sur le mode d'action des hormones thyroïdiennes à leur désiodation.

RESUME

On ne connaît pas la nature des produits carbonés qui résultent de la désiodation physiologique des hormones thyroïdiennes ; c'est pourquoi nous avons synthétisé la thyronine et ses dérivés iodés marqués par le tritium (^{3}H).

PREMIÈRE PARTIE

Nous avons préparé l'ensemble des thyronines tritiées en des positions stables bien déterminées, avec des activités spécifiques suffisantes pour effectuer des expériences dans des conditions physiologiques.

A. — Nous avons précisé les techniques de comptage par scintillation liquide de composés tritiés et nous en avons mis au point de nouvelles.

B. — La première méthode conduit, par désiodation catalytique de la iodo-3,5 thyronine (T_2), par le gaz tritium, à la iodo-3, thyronine (T_1) et à la thyronine (T_0). L'iodation ultérieure de ces deux corps avec ^{131}I fournit respectivement : la iodo-3,3' thyronine (T'_2) et la iodo-3,3',5' thyronine (T'_3), la iodo-3' thyronine (T'_1) et la iodo-3',5' thyronine (T''_2), marquées simultanément par ^{3}H en 3 ou 3,5 et par ^{131}I en 3' ou 3',5'.

C. — La seconde méthode consiste en la réduction, par l'acide iodhydrique tritié, de l'acide méthoxy-4', phénoxy-4, iodo-3,5 α-benzamidocinnamique en iodo-3,5 thyronine tritiée sur les positions α-β de la chaîne alanine. Par iodation de ce corps avec ^{131}I on obtient la iodo-3,5,3' thyronine et la thyroxine doublement marquées par ^{3}H en α-β du reste alanine et par ^{131}I en 3' ou 3',5'.

Les deux méthodes sont générales et peuvent être appliquées à la tritiation d'autres molécules d'intérêt biologique dont nous avons préparé quelques-unes. De plus, elles peuvent être combinées pour varier les positions du traceur ou obtenir une activité spécifique supérieure.

DEUXIÈME PARTIE

A. — Nous avons étudié *in vitro*, qualitativement, la désiodation des iodothyronines doublement marquées, par des systèmes biologiques de plus en plus purifiés : coupes et homogénats de tissus, mitochondries, préparation enzymatique. Les résultats de ces expériences concordent et montrent que le produit carboné essentiel provenant de la désiodation de T_4 et de T_3 n'est pas la thyronine (T_0) mais un complexe protéique (PX) contenant la totalité du tritium correspondant à l'iodothyronine disparue et une faible partie de ^{131}I. Le reste de la radioactivité de ^{131}I se trouve sous forme d'iodure minéral.

B. — Des études cinétiques effectuées avec des coupes, des mitochondries et des préparations purifiées de thyroxine-désiodase montrent que le complexe protéique s'accumule dans le milieu et que sa teneur en iode diminue en fonction du temps. La vitesse de désiodation de PX dépend de la forme optique de la molécule : nulle pour D-T_4, elle est deux fois plus faible pour D-L-T_4 que pour L-T_4. Les inhibiteurs de la désiodation sont de deux types : les réducteurs diminuent le taux de formation de PX, mais n'affectent pas sa vitesse de désiodation, alors qu'elle est fortement diminuée par EDTA et les thyronines.

C. — Le métabolisme cellulaire de T_0 tritiée conduit également à la formation d'un complexe protéique.

Dans PX formé par désiodation de T_4, la liaison qui unit la petite molécule tritiée à la protéine n'a pu être rompue qu'au cours d'une protéolyse par des enzymes pancréatiques totales, qui libère un composé unique dont les Rf sont ceux de la thyroxine et la teneur en iode très faible. Ce métabolite nouveau que nous avons appelé « sosie de T_4 » est instable et conduit par rupture du pont phénoxydique à de l'iodure radioactif et de la DIT tritiée.

L'action de FMN sur la thyroxine, en l'absence de système protéique, à des pH basiques et en présence de lumière, donne naissance au « sosie de T_4 » qui se décompose partiellement en DIT tritiée et iodure radioactif.

CONCLUSION

A partir d'un ensemble d'observations, nous proposons pour le « sosie de T_4 » une formule de type semi-quinonique avec liaison radicalaire secondaire d'un atome d'iode radioactif libéré par désiodation. Cette structure permet d'expliquer nos résultats et de proposer un mécanisme pour la réaction de désiodation. En conclusion, nous formulons l'hypothèse que désiodation et activité sont les deux manifestations d'une même réalité biologique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Adams (M.). — *Am. Chem. J.*, **28**, 198 (1902).
2. Albert (S.), Heard (R.D.H.), Leblond (C.P.) & Saffran (G.). — *J. Biol. Chem.*, **177**, 247 (1949).
3. Albright (E.C.), Larson (F.C.) & Tust (R.H.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **86**, 137 (1954).
4. Albright (E.C.), Tomita (K.) & Larson (F.C.). — *Endocrinology*, **64**, 208 (1959).
5. Alpers (J.B.) & Rall (J.E.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, **15**, 1482 (1955).
6. Astwood (E.B.). — *Brookhaven Symposia in Biology*, **7**, 40 (1955).
7. Barkdoll (A.E.) & Ross (W.F.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 898 (1944).
8. Barton (J.M.), Evans (R.S.) & Gardner (J.A.F.). — *Nature*, **170**, 249 (1952).
9. Baumann (E.). — *Z. Physiol. Chem., Hoppe-Seyler's*, **22**, 1 (1896).
10. Blake (R.K.), Roderick (J.F.) & Umberger (J.Q.). — « Intensification of radiographs by toning », E.I. du Pont de Nemours and Company, Inc., Photo Products Department, Wilmington, Delaware.
11. Block (R.J.), Mandl (R.H.), Keller (S.) & Werner (S.C.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 508 (1958).
12. Blum (F.). — *Schweiz. Med. Wschr.*, **57**, 808 (1927).
13. Blum (F.) & Grutzner (R.). — *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **85**, 429 (1914).
14. Blumberg (B.S.), Farer (L.), Rall (J.E.) & Robbins (J.). — *Endocrinology*, **68**, 24 (1961).
15. Bolling (D.), Sober (H.A.) & Block (R.J.). — *Federation Proc.*, **8**, 185 (1949).

16. Bowden (C.H.), Maclagan (N.F.) & Wilkinson (J.H.). — *Biochem. J.*, **59**, 93 (1955).

17. Canzanelli (A.), Harington (C.R.) & Randall (S.S.). — *Biochem. J.*, **28**, 68 (1934).

18. Chalmers (J.R.), Dickson (G.T.), Elks (J.) & Hems (B.A.). — *J. Chem. Soc.*, 3434 (1949).

19. Chen (P.S.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**, 546 (1958).

20. Closon (J.). — Thèse de Doctorat de l'Université de Paris, 1958.

21. Courrier (R.), Roche (J.), Michel (O.), Michel (R.) & Colonge (R.M.A.). — *Compt. Rend.*, **243**, 5 (1956).

22. Cruchaud (S.), Vannotti (A.), Mahaim (C.) & Deckelman (J.). — *Lancet*, **2**, 906 (1955).

23. Délépine (M.) & Horeau (A.). — *Bull. soc. chim. France*, 33 (1937).

24. Dempsey (E.W.). — *Endocrinology*, **34**, 27 (1944).

25. Etling (N.) & Barker (S.B.). — *Endocrinology*, **64**, 753 (1959).

26. Etling (N.) & Barker (S.B.). — *Endocrinology*, **65**, 95 (1959).

27. Farmer (E.C.) & Berstein (I.A.). — *Science*, **115**, 460 (1952).

28. Fink (K.) & Fink (R.M.). — *Science*, **108**, 358 (1948).

29. Flock (E.V.), Bollman (J.L.) & Grindlay (J.H.). — *Endocrinology*, **67**, 419 (1960).

30. Flock (E.V.), Bollman (J.L.), Grindlay (J.H.) & Stobie (G.H.). — *Endocrinology*, **69**, 626 (1961).

31. Foye (W.O.) & Stoyle (L.E. Jr.). — *J. Am. Pharm. Assoc.*, **48**, 201 (1959).

32. Freinkel (N.), Ingbar (S.H.) & Dowling (J.T.). — *J. Clin. Invest.*, **36**, 25 (1957).

33. Friedgood (H.B.), Garst (J.B.) & Smit (H.). — *J. Biol. Chem.*, **174**, 523 (1948).

34. Galton (V.A.) & Ingbar (S.H.). — *Endocrinology*, **69**, 30 (1961).

35. Geiger (J.W.) & Wright (L.D.). — *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **2**, 282 (1960).

36. Gemill (C.L.), Anderson (J.J.) & Burger (A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2434 (1956).

37. Glascock (R.F.) & Reinius (L.R.). — Proc. 2nd Radioisotope Conf. Oxford, I. Med. and Physiol. Applications, 262 (1954).

38. Gordon (A.H.), Gross (J.), O'Connor (D.) & Pitt-Rivers (R.). — *Nature,* **169**, 19 (1952).

39. Grall (S.). — Diplôme d'Etudes Supérieures, 1962 (sous presse).

40. Grosdemange (J.). — Diplôme d'Etudes Supérieures, 1962.

41. Gross (J.) & Leblond (C.P.). — *Endocrinology,* **18**, 714 (1950).

42. Gross (J.) & Leblond (C.P.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **76**, 686 (1951).

43. Gross (J.) & Pitt-Rivers (R.). — *Biochem. J.,* **53**, 645 (1953).

44. Haddad (H.M.) & Rall (J.E.). — *Endocrinology,* **67**, 413 (1960).

45. Harington (C.R.). — *Biochem. J.,* **20**, 293 (1926).

46. Harington (C.R.). — *Biochem. J.,* **20**, 300 (1926).

47. Harington (C.R.). — *Proc. Roy. Soc.,* B. **132**, 223 (1944).

48. Harington (C.R.) & Barger (G.). — *Biochem. J.,* **21**, 169 (1927).

49. Harington (C.R.) & Pitt-Rivers (R.). — *J. Chem. Soc.,* 1101 (1940).

50. Harington (C.R.) & Randall (S.S.). — *Biochem. J.,* **23**, 373 (1929).

51. Hayes (F.N.), Hiebert (R.D.) & Schuch (R.L.). — *Science,* **116**, 3006 (1952).

52. Hayes (F.N.), Ott (D.G.) & Kerr (V.N.). — *Nucleonics,* **14**, 43 (1956).

53. Hayes (F.N.), Rogers (B.S.) & Sanders (P.C.). — *Nucleonics,* **13**, 46 (1955).

54. Hogness (J.R.), Berg (M.), Van Arsdel (P.P. Jr.) & Williams (R.H.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **90**, 93 (1955).

55. Ingbar (S.H.). — *Endocrinology,* **63**, 256 (1958).

56. Ingbar (S.H.) & Freinkel (N.). — *J. Clin. Invest.,* **34**, 808 (1955).

57. Johnson (T.B.) & Tewkesbury (L.B. Jr.). — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* **28**, 73 (1942).

58. Kalant (H.), Lee (R.) & Sellers (E.A.). — *Endocrinology,* **56**, 127 (1955).

59. Kendall (E.C.). — *J. Biol. Chem.,* **39**, 125 (1919).

60. Larson (F.C.) & Albright (E.C.). — *J. Clin. Invest.,* **40**, 1132 (1961).

61. Larson (F.C.), Tomita (K.) & Albright (E.C.). — *Endocrinology,* **57**, 338 (1955).

62. Laver (W.G.) & Trikojus (V.M.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **16**, 592 (1955).

63. Lein (A.). — *Endocrinology,* **63**, 237 (1958).

64. Lissitzky (S.). — Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1952.

65. Lissitzky (S.). — Simposio su gli ipertiroidismi, Napoli, 1959 (Giardini, Pisa).

66. Lissitzky (S.), Benevent (M.T.) & Roche (J.). — *Compt. rend. soc. biol.,* **152**, 10 (1958).

67. Lissitzky (S.), Benevent (M.T.) & Roques (M.). — *Compt. rend. soc. biol.,* **154**, 755 (1960).

68. Lissitzky (S.), Benevent (M.T.) & Roques (M.). — *Bull. soc. chim. biol.,* **43**, 743 (1961).

69. Lissitzky (S.), Benevent (M.T.) & Roques (M.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **51**, 407 (1961).

70. Lissitzky (S.), Bouchilloux (S.) & Kertesz (D.). — *Bull. soc. chim. biol.,* **39**, 133 (1957).

71. Lissitzky (S.) & Michel (R.). — *Bull. soc. chim. France,* 891 (1952).

72. Lissitzky (S.), Michel (R.), Roche (J.) & Roques (M.). — *Bull. soc. chim. biol.,* **38**, 1413 (1957).

73. Lissitzky (S.), Roques (M.) & Benevent (M.T.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **41**, 252 (1960).

74. Lissitzky (S.), Roques (M.) & Benevent (M.T.). — *Bull. soc. chim. biol.,* **43**, 727 (1961).

75. Lissitzky (S.), Roques (M.), Benevent (M.T.) & Pinchera (A.). — *Compt. rend. soc. biol.,* **152**, 1431 (1958).

76. Loftfield (R.B.) & Eigner (E.A.). — *Biochem. Biophys. Research Commun.,* **3**, 72 (1960).

77. Mac Lagan (N.F.) & Reid (D.). — *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinol.,* **10**, 190 (1956).

78. Maquenne (L.). — *Bull. soc. chim. France,* **9**, 98 (1893).

79. Matsuura (T.) & Cahnman (H.J.). — *J. Am. Chem. Soc.,* **81**, 871 (1959).

80. Matsuura (T.) & Cahnman (H.J.). — *J. Am. Chem. Soc.,* **82**, 2055 (1960).

81. Michel (R.), Truchot (R.), Tron-Loisel (H.) et Poillot (B.). — *Bull. soc. chim. biol.*, **42**, 1207 (1960).

82. Moses (V.) & Calvin (M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 297 (1959).

83. Niemann (C.). — *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe*, **7**, 167 (1950).

84. Nunez (J.). — Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1958.

85. Oswald (A.). — *Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's*, **27**, 14 (1899).

86. Passmann (J.M.), Radin (N.S.) & Cooper (J.A.D.). — *Anal. Chem.*, **28**, 484 (1956).

87. Pitt-Rivers (R.). — *Nature*, **161**, 308 (1948).

88. Plaskett (L.G.). — *Nature*, **181**, 273 (1958).

89. Plaskett (L.G.). — *Biochem. J.*, **78**, 652 (1961).

90. Robbins (J.) & Rall (J.E.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **81**, 530 (1952).

91. Robertis (E. de). — *Anat. Record*, **80**, 219 (1941).

92. Robertis (E. de) & Grasso (R.). — *Endocrinology*, **38**, 137 (1946).

93. Roche (J.), Jutisz (M.), Lissitzky (S.) & Michel (R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 257 (1951).

94. Roche (J.), Lissitzky (S.) & Michel (R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 220 (1953).

95. Roche (J.), Michel (O.), Michel (R.), Gorbman (A.) & Lissitzky (S.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **12**, 570 (1953).

96. Roche (J.), Michel (O.), Michel (R.) & Tata (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 471 (1954).

97. Roche (J.), Michel (R.), Closon (J.) & Michel (O.). — *Compt. rend. soc. biol.*, **152**, 245 (1958).

98. Roche (J.), Michel (R.), Etling (N.) & Nunez (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 490 (1956).

99. Roche (J.), Michel (R.), Etling (N.) & Nunez (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 550 (1956).

100. Roche (J.), Michel (R.), Jouan (P.) & Wolf (W.). — *Endocrinology*, **59**, 425 (1956).

101. Roche (J.), Michel (R.), Michel (O.) & Lissitzky (S.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 161 (1952).

102. Roche (J.), Michel (R.) & Nunez (J.). — *Acta Endocrinol.*, **32**, 142 (1959).

103. Roche (J.), Michel (R.), Nunez (J.) & Jacquemin (C.). — *Bull. soc. chim. France,* 715 (1959).

104. Roche (J.), Michel (R.), Nunez (J.) & Jacquemin (C.). — *Endocrinology,* **65**, 402 (1959).

105. Roche (J.), Michel (R.) & Tata (J.). — *Compt. rend. soc. biol.,* **146**, 1003 (1952).

106. Roche (J.), Michel (R.), Truchot (R.), Wolf (W.) & Michel (O.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **20**, 337 (1956).

107. Roche (J.), Michel (R.) & Wolf (W.). — *Bull. soc. chim. France,* 462 (1957).

108. Roche (J.), Michel (R.) & Wolf (W.). — *Bull. soc. chim. France,* 464 (1957).

109. Roche (J.), Michel (R.) & Wolf (W.). — *Bull. soc. chim. France,* 468 (1957).

110. Roche (J.), Michel (R.), Wolf (W.) & Nunez (J.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **19**, 308 (1956).

111. Salvatore (G.), Covelli (I.) & Roche (J.). — *Compt. rend. soc. biol.,* **154**, 1743 (1960).

112. Saul (J.A.) & Trikojus (V.M.). — *Biochem. J.,* **42**, 80 (1948).

113. Schneider (W.C.) & Potter (V.R.). — *J. Biol. Chem.,* **177**, 893 (1949).

114. Seliger (H.H.) & Agranoff (B.W.). — *Anal. Chem.,* **31**, 1607 (1959).

115. Spiteri (J.) & Nunez (J.). — *Compt. rend.,* **234**, 2603 (1952).

116. Sprott (W.E.) & Mac Lagan (N.F.). — *Biochem. J.,* **59**, 288 (1955).

117. Stanbury (J.B.). — *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* **86**, 417 (1960).

118. Suzuki (M.), Ishikawa (I.), Shimizu (S.) & Yamamoto (K.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **51**, 403 (1961).

119. Tata (J.R.). — Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1954.

120. Tata (J.R.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **28**, 91 (1958).

121. Tata (J.R.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **28**, 95 (1958).

122. Tata (J.R.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **35**, 567 (1959).

123. Tata (J.R.). — *Bull. soc. chim. biol.,* **42**, 1171 (1960).

124. Tata (J.R.). — *Nature,* **187**, 1025 (1960).

125. Tata (J.R.). — *Biochem. J.,* **77**, 214 (1960).

126. Tata (J.R.) & Brownstone (A.D.). — *Nature*, **185**, 34 (1960).

127. Tata (J.), Rall (J.E.) & Rawson (R.W.). — *Endocrinology*, **60**, 83 (1957).

128. Tata (J.R.), Widnell (C.C.) & Gratzer (W.B.). — *Clin. Chim. Acta*, **6**, 597 (1961).

129. Taurog (A.), Briggs (F.N.) & Chaikoff (I.L.). — *J. Biol. Chem.*, **191**, 29 (1951).

130. Taurog (A.), Chaikoff (I.L.) & Franklin (A.L.). — *J. Biol. Chem.*, **161**, 537 (1945).

131. Taurog (A.), Wheat (J.D.) & Chaikoff (I.L.). — *Am. Goiter Assoc. Ann. Meeting Abstr.*, **22** (1955).

132. Tomita (K.), Lardy (H.A.), Larson (F.C.) & Albright (E.C.). — *J. Biol. Chem.*, **224**, 387 (1957).

133. Torresani-Cayet (J.). — Thèse de Doctorat en Médecine, Marseille, 1960.

134. Vaughan (M.), Steinberg (D.) & Logan (J.). — *Science*, **126**, 446 (1957).

135. Wang (C.H.) & Jones (D.E.). — *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **1**, 203 (1959).

136. Wilson (A.T.). — *Nature*, **182**, 524 (1958).

137. Wilzbach (K.E.), Kaplan (L.) & Brown (W.G.). — *Science*, **118**, 522 (1953).

138. Winzler (R.J.) & Notrica (S.R.). — *Federation Proc.*, **11**, 312 (1952).

139. Wollman (S.H.). — *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **86**, 354 (1960).

140. Yamamoto (K.), Shimizu (S.) & Ishikawa (I.). — *Japan. J. Physiol.*, **10**, 594 (1960).

141. Yamamoto (K.), Shimizu (S.) & Ishikawa (I.). — *Japan. J. Physiol.*, **10**, 610 (1960).

142. Yamamoto (K.), Shimizu (S.) & Ishikawa (I.). — *Gunma J. Med. Sci.*, **9**, 110 (1960).

143. Yamazaki (E.) & Slingerland (D.W.). — *Endocrinology*, **64**, 126 (1959).

144. Zeigler (C.A.), Chleck (D.J.) & Brinkerhoff (J.). — *In* « Liquid scintillation counting » (Bell, C.G. Jr. & Hayes, N.F., eds.), p. 185, Pergamon Press, 1958.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GENERALE 9

ABREVIATIONS 12

Première partie

SYNTHESE DES THYRONINES
MARQUEES PAR LE TRITIUM

MÉTHODES GÉNÉRALES DE PRÉPARATION DES THYRONINES 15

I. MÉTHODES DE COMPTAGE DES CORPS TRITIÉS 24

II. SYNTHÈSE DES THYRONINES DES SÉRIES DE LA THYRONINE ET DE LA IODO-3, THYRONINE 33

III. SYNTHÈSE DES THYRONINES DE LA SÉRIE DE LA IODO-3, 5, THYRONINE . . . 47

Deuxième partie

METABOLISME DES THYRONINES
MARQUEES PAR LE TRITIUM

INTRODUCTION 59

I. ETUDE QUALITATIVE COMPARÉE DE LA DÉSIODATION DES IODOTHYRONINES MARQUÉES PAR LE TRITIUM ET L'IODE RADIOACTIF 62

— *Etude de la désiodation de T_3 et de T_4 par incubation avec des coupes d'organes et des homogénats* 63

— *Etude de la désiodation de T_4 par incubation en présence de fractions cellulaires* 73

— *Etude de la désiodation de T_3 et T_4 tritiées par incubation avec une préparation purifiée de thyroxine-désiodase* 75

— *Discussion* 77

II. Etude cinétique de la désiodation de T_4 et de T_3 marquées par ^{131}I et par ^{3}H 79

— *Etude cinétique de la désiodation par différents systèmes* 79

— *Etude de facteurs influant sur la désiodation* 89

— *Discussion* 94

III. Nature des métabolites de la désiodation de la thyroxine 98

— *Métabolisme de la thyronine* 98

— *Etude des métabolites de la désiodation* 101

— *Discussion* 112

DISCUSSION GENERALE 114

RESUME 123

BIBLIOGRAPHIE 125

Imprimerie R. Foulon & Cie, 29, Rue Deparcieux, Paris XIV^e^

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

L'EFFET ISOTOPIQUE EN BIOCHIMIE

Vu et approuvé :
Paris, le 23 janvier 1962
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
MARC ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
JEAN ROCHE